

**Untersuchungen über Beziehungen zwischen
Penicillinaseaktivität und Hemmkonzentration
bei verschiedenen Penicillinen und Cephalothin
gegenüber Staphylokokken und gramnegativen
Stäbchenbakterien**

Helge Ohgke

1973

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie der Universität München

Direktor: Prof.Dr.Dr.H. Eyer

" Untersuchungen über Beziehungen zwischen Penicillin-
aseaktivität und Hemmkonzentration bei verschiedenen
Penicillinen und Cephalothin gegenüber Staphylokokken
und gramnegativen Stäbchenbakterien "

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helge Ohgke

aus

München

1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.H. Metz

Mitberichterstatter: Prof.Dr.Dr. H. Eyer

Dekan: Prof.Dr.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.1.1973



Inhalt

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literaturüberblick	2
III. Material und Methoden	5
1. Bakterienstämme	5
2. Biochemische Reaktionen der Keime der Proteus-Klebsiella-Gruppe	5
3. Kulturmedien	8
4. Reihenverdünnungstest	9
5. Keimzahlbestimmung	10
6. Bestimmung der Penicillinaseaktivität	11
7. Statistische Methode	15
IV. Ergebnisse	16
1. Vorversuche	16
2. Einteilung der Proteus-und Kleb - siella-Stämme in Species	20
3. Hemmkonzentrationen im Reihenver- dünnungstest	23
4. Penicillinaseaktivität der Bakterien	28
5. Hemmkonzentrationen und Penicillin - aseaktivität	31
V. Diskussion	35
VI. Zusammenfassung	60
VII. Literaturverzeichnis	62
VIII. Abbildungen	83



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0052

I. Einleitung

Penicillinase (E.C. 3.5.2.6) oder Penicillin-amido- β -lactam-hydrolase (33) kommt bei zahlreichen Bakteriengattungen vor (22).

Die Öffnung des β -Lactamringes von Penicillinen und Cephalosporinen führt zu antibiotisch unwirksamen Spaltprodukten. Deshalb kann die Bildung des Enzyms als Mechanismus der Antibiotika-Resistenz von Mikroorganismen betrachtet werden. Neben dem Trivialnamen "Penicillinase" sind auch die Bezeichnungen "Cephalosporinase", "Ampicillinase" oder "Carbenicillinase" gebräuchlich (58,65,78), wenn damit der Abbau des betreffenden Antibiotikums bezeichnet werden soll.

II. Literaturüberblick

Die biologische Funktion der Penicillinase ist noch nicht entschieden (77,92). Nach Saz (92) wirken bestimmte cyclische Peptide, z.B. *Homogrammicidin S*, die keinerlei Verwandtschaft zum Penicillin haben, als Induktoren und Substrate der Penicillinasen. Nach Ozer (71) wirken bestimmte Zellwandfraktionen induktiv auf die Penicillinase, was auf eine Beteiligung des Enzyms an der Zellwandsynthese hinweist.

Andrerseits wurde Penicillinase bisher nur bei Organismen gefunden, deren Zellhülle Mucopeptide enthält, Substanzen, deren Synthese durch Penicillin gestört werden kann (77). Das häufige Erscheinen von Penicillinase-bildenden Bakterien in der klinischen Bakteriologie gilt als Selektionsfolge der Penicillintherapie (75). Da außerdem Penicilline und Cephalosporine als Naturstoffe vorkommen, kann die Penicillinase als Faktor der mikrobiellen Ökologie betrachtet werden (77).

Dabei besteht die Aufgabe des Enzym darin, durch Hydrolyse den Angriff des Antibiotikums abzuwehren. Einige grampositive Bakterien können das Enzym in großen Mengen bilden und ins Medium abgeben, wodurch die antibiotisch wirksame Penicillin -

konzentration rasch absinkt (107), Diese Eigenschaft besitzt vorwiegend *St.aureus*, sodaß Penicillin-resistente Stämme dieser Species Penicillinase bilden (75).

Bei gramnegativen Bakterien wurde Penicillinase nicht immer nachgewiesen (78). Bei gramnegativen Penicillinasebildnern ist das Enzym in geringerer Menge als bei grampositiven Keimen vorhanden, und die volle Aktivität erst nach Zellaufschluss messbar (99). Die bestehende Permeabilitäts - schranke erlaubt das Eindringen von nur kleinen Mengen eines β -Lactam-Antibiotikums in das Zellinnere, sodaß diese auch von einer kleinen Enzymmenge gespalten werden können (22).

Die für die enzymatische Penicillinhydrolyse bei gramnegativen Keimen niedrige Aktivierungsenergie kommt der Wirkung der Permeabilitäts - schranke entgegen. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der Penicillinase an der Resistenz gramnegativer Bakterien war die Entdeckung von Anderson und Datta (4) , wonach mit einem genetischen Faktor für die Ampicillin-Resistenz auch die Fähigkeit zur Penicillinasebildung zwischen Enterobacteriaceen

übertragen wird. Durch Vergleich der Hydrolyse -
raten für verschiedene Penicillin - und Cephalo -
sporinderivate ergaben sich Substratprofile, die
verschiedenen Enzymtypen entsprachen (28,31,70,
102,103). Diese Substratprofile charakterisieren
nicht nur ein bestimmtes chromosomales oder extra -
chromosomales Element (28,34,70,91), sondern
können auch weitgehend dem Resistenzbild eines
Stammes zugrundegelegt werden (27,47,102,103).
Trotz dieser Übereinstimmung von Enzymtyp und
Verhalten gegenüber den β -Lactam-Antibiotika
wurde eine direkte Beziehung zwischen Resistenz -
grad und Höhe der Enzymaktivität nicht immer
gefunden (6,18,41,47,70,91). Deshalb erschien es
uns interessant, bei in menschlichem Untersuchungs -
material häufig vorkommenden Erregern neben den
Hemmkonzentrationen die Penicillinase quantitativ
zu bestimmen.

III. Material und Methoden

1. Bakterienstämme

Von den in der Zeit von Dezember 1970 bis Februar 1971 im bakteriologischen Routinelabor aus klinischem Untersuchungsmaterial isolierten Bakterienarten wurden 125 Stämme untersucht. Diese Zahl setzt sich zusammen aus je 25 Stämmen von *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyanea* und der *Proteus* - und *Klebsiella*-Gruppe.

Bei der Auswahl wurden im Blättchentest Ampicillin-resistente Keime bevorzugt, jedoch nicht ausschließlich berücksichtigt.

Die Herkunft der Stämme aus dem Untersuchungsmaterial zeigt Tabelle 1.

2. Biochemische Reaktionen der Keime der

Proteus - und *Klebsiella*-Gruppe.

Auf Grund unterschiedlichen biochemischen Verhaltens können die Keime der *Proteus* - und *Klebsiella*-Gruppe jeweils verschiedenen Species zugeordnet werden.

Untersuchungsmaterial	Urin	Sputum	Wundabstrich	Ohrabstrich	Vaginalabstrich	Eiter	Galle	Blut	Nasenabstrich	Kiefernhöhlenabstrich	Harnröhrenabstrich	Nagel	Blut a.d. Bauchhöhle	Augenabstrich	Trachealabstrich	Cervicalabstrich	Stuhl	
aureus		4	11	2	1			2	1	1	2			1				25
coli	14	3	2	1	2		1					1	1					25
pneumoniae	15	5	1	1			1		1							1		25
irabilis	12	2	2	2	1				1	1							1	22
ulgaris		1					1											2
organii						1												1
pyocyanea	13	3	2	3		2			1						1			25
Summe	54	18	18	9	4	3	3	2	4	2	2	1	1	1	1	1	1	125

Tabelle 1 : Herkunft von 125 Bakterienstämmen aus
klinischem Untersuchungsmaterial.

In der bunten Reihe wurden geprüft:

Glukose- und Laktosespaltung, Schwefelwasserstoff-
bildung, Harnstoffspaltung, Beweglichkeit und
Indolbildung (Kovacs'Reagenz) sowie die Voges-
Proskauer- und Methylrotreaktion. Weiterhin
wurde die Ornithindecaboxylase mit einer Papier-
streifenmethode (Patho-Tec-LD, General Diagnostics
Division, Warner-Chilcott) nachgewiesen.
Die Ergebnisse wurden nach 24 bzw. 48 Stunden
Bebrütung bei 37°C abgelesen.

3. Kulturmedien

Nachdem im Routinelabor die Antibiotika-Empfindlichkeit im Blättchentest bestimmt worden war, wurden die Bakterien auf Schrägagar übertragen und unter Lichtabschluss aufbewahrt.

Vor jeder weiteren Verwendung wurden die aufbewahrten Kulturen auf eine Agarplatte ausgeimpft, um die Reinheit der Kulturen zu überprüfen.

18- bis 20-stündige Kulturen, die als Einsaat für die Penicillinase- und Resistenzbestimmung dienen, wurden in Nährbouillon überimpft.

Für die photometrische Penicillinasebestimmung in Bakterienkulturen waren eiweißhaltige Nährböden ungeeignet wegen der hohen Extinktion der Proben bei der verwendeten Wellenlänge von 250 m. . Deshalb wurde eine für die Untersuchung der chemischen Reaktionen gramnegativer Bakterien geeignete synthetische Nährflüssigkeit gewählt ⁺⁾ ,

⁺⁾ 2g NH_4Cl , 6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 3g KH_2PO_4 , 3g NaCl , 0,085g MgCl_2 , 0,115g Na_2SO_4 in 1000 ml aqua dest. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 wurde die Nährlösung bei 1,1 atü und 120°C sterilisiert und anschliessend 10 ml sterile 20%ige Glukoselösung zugesetzt.

die frei von stark lichtabsorbierenden Substanzen war und eine gleichbleibende Zusammensetzung hatte.

4. Reihenverdünnungstest

Die Bestimmung der für einen Bakterienstamm wachstumshemmenden Konzentration eines Antibiotikums erfolgte in Resistenzbouillon (Fa.Oxoid). Die 1-ml-Testvolumina bestanden aus 0,9 ml Resistenzbouillon und 0,1 ml des verdünnten Antibiotikums, das vor Beimpfen zugegeben wurde. Die geometrische Verdünnungsreihe des Antibiotikums wurde in sterilem 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,8, aus einer Stammlösung im gleichen Puffer hergestellt.

Folgende Antibiotika ⁺⁾ wurden hierbei verwendet:
Penicillin G (Benzylpenicillin-Natrium),
Ampicillin (α -Aminobenzylpenicillin),
Carbenicillin (α -Carboxybenzylpenicillin-Dinatrium),
Cephalothin (7-Thiophen-2-acetamido-Cephalosporansäure).

⁺⁾ Die Substanzen waren uns freundlicherweise von den Herstellern überlassen worden.

Die verschiedenen Antibiotika-haltigen Verdünnungsreihen, einschließlich Kontrolle, wurden mit einer 18 bis 20 Stunden bebrüteten Bouillonkultur beimpft. Dazu diente eine kleine, genormte Öse, die eine regelmässige Einsaat von 0,001 ml ermöglichte.

Nach 24-stündiger Bebrütung wurde als minimale Hemmkonzentration des Antibiotikums die Röhrchenkonzentration abgelesen, bei der noch kein Bakterienwachstum zu sehen war.

5. Keimzahlbestimmung mit einer Objektträgermethode

Die zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Resistenz- und Penicillinasebestimmungen notwendige Keimzählung wurde mit einer Objektträgermethode ausgeführt ("Urikultur" der Fa.Boehringer, Mannheim). Der mit Nähr-und MacConkey-Agar beschichtete Objektträger wurde kurz in die bakterienhaltige Flüssigkeit getaucht und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Die Wachstumsdichte der Kolonien auf dem Objektträger wurde mit Mustern verglichen, die eine Unterscheidung von Keimzahlen zwischen 10^3 , 10^4 und 10^5 / ml erlauben. Bei sichtbarer Trübung einer Kultur,

d.h. bei einer Keimzahl von über $10^5/\text{ml}$, wurde die Kultur $1:10^2$ bis $1:10^5$ verdünnt, und der Objektträger in die Verdünnung getaucht. Die Keimzahl der Kultur wurde so unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt.

6. Bestimmung der Penicillinaseaktivität.

a) Vorbereitung der Kulturen

Die Penicillinaseaktivität der Staphylococcus aureus-, E.coli-, Klebsiella- und Proteus-Stämme wurde in der späten logarithmischen Wachstumsphase gemessen.

Zur Kontrolle des Wachstums wurde für je einen Stamm jeder Bakterienart nach Beimpfen die optische Dichte der Kultur registriert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Keimzahl durch Keimzählung bestimmt, um eine Standardkurve aus Zeit, Extinktion und Keimzahl zu erhalten.

Wegen der Neigung des Enzyms an Glas zu haften (53), wurden die Innenflächen kurzer Reagenzgläser mit Silikonpaste (Wacker Chemie) ausgerieben und im Wärmeschrank getrocknet (59).

Die 10 Minuten bei 120°C autoklavierten Röhrchen wurden mit 5 ml synthetischer Nährflüssigkeit

für gramnegative Bakterien und 3 ml Nährbouillon für Staphylokokken gefüllt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Mit einer Einsaat von 0,05 ml, die aus einer 18 bis 20 Stunden bebrüteten Nährbouillon pipettiert wurden, konnten die gramnegativen Stämme (ausser *Ps.pyocyanea*) nach 4 bis 5 Stunden und die Staphylokokken nach 6 1/2 Stunden bei einer Keimzahl von etwa 10^{10} / ml in der späten logarithmischen Wachstumsphase untersucht werden. Die Kulturen wurden im Wasserbad bei 37°C bebrütet und in 1/2- bis 1-stündigem Abstand zur Wachstumskontrolle im Photometer kurz herausgenommen. Die Extinktionsmessung erfolgte bei der Wellenlänge 546 m μ (Photometer Eppendorf) in einem für die Aufnahme der Röhrchen geeigneten Küvettenhalter. Das unbeimpfte Vergleichs- und das Messröhrchen erhielten Bezugsmarken, um zu vermeiden, daß der Strahlengang des Photometers bei folgenden Messungen die Glaswände an unterschiedlichen Stellen schneidet, was bei der Unregelmäßigkeit der Wandungen zu stark schwankenden Messwerten geführt hätte.(61).

Vorbereitung der Ps.pyocyanea-Kulturen

Ps.pyocyanea-Kulturen bilden ein oberflächliches Häutchen und Bakterienkrümel, wodurch Trübungsmessung in der Kultur und Entnahme gleichmäßig zusammengesetzter Proben nicht möglich sind. Da sich auch das Wachstum deutlich langsamer zeigte als bei den übrigen Bakterienarten, wurden für Ps.pyocyanea andere Kulturbedingungen gewählt:

10 ml synthetische Nährflüssigkeit, mit 0,1 ml einer 8 Stunden bebrüteten Peptonbouillon beimpft, wurden in 50-ml-Erlenmeyerkolben bei 37°C 16 Stunden geschüttelt. Die so erhaltenen gleichmäßig trüben Kulturen enthielten 10^{11} bis 10^{12} Keime pro Milliliter.

b) Freisetzung von Penicillinase

In Kulturen gramnegativer Bakterien:

Nach Einstellen des pH-Wertes der Kulturen auf 7,2 (pH-Meter H-5 der Fa. Beckman) durch Zugabe von $n/10$ NaOH wurde den zu untersuchenden Bakterienkulturen 10 Vol.% Toluol (86) zugesetzt und die Mischung während 10 Minuten bei Zimmer -

temperatur dreimal kräftig durchgeschüttelt
(Circomix der Fa. Bachofer).

Nachdem sich Toluol und Kulturflüssigkeit voneinander abgesetzt hatten, wurde die Probe mit einer Pipette entnommen.

Bei St.aureus-Kulturen

3 ml Nährbouillon wurden mit 0,05 ml einer 18- bis 20-stündigen Bouillon beimpft und bei 37°C im Wasserbad bebrütet. Nach Erreichen einer optischen Dichte, die etwa 10^{10} Keimen pro ml entspricht, wurden die Zellen vom Medium durch Zentrifugieren getrennt, das Sediment in 1 ml Wasser und 2 ml einer sterilen Lösung aus 0,2 m Phosphatpuffer, pH 7,6, und 0,01 m Glukose suspendiert und in ein Wasserbad von 37°C gestellt (24,25). Nach einer Stunde wurden die Proben entnommen.

c) Photometrische Bestimmung der Penicillinase

Die Aktivität der Penicillinase wurde mit einer spektrophotometrischen Methode (84) gemessen. Dabei reagiert die bei der enzymatischen Penicillin-spaltung entstehende Penicillosäure mit Mercuri -

benzoat zu einem Mercaptid, das eine Zunahme der Extinktion im UV-Bereich bedingt.

Das Reaktionsgemisch aus 13,5 ml 25 μ M-p-Chlor-mercuribenzoat in 0,1 Phosphatpuffer vom pH 6,8 und 0,1 ml der zu untersuchenden Probe wurde in zylindrischen 5 cm - Quarzküvetten angesetzt. Nach Zugabe von 0,1 ml 20 mM Penicillin G in die Messküvette wurde die Zunahme der Extinktion bei 250 m μ beobachtet (Spektralphotometer Modell G-4700 der Fa. Beckman).

Vor Beginn der Messungen wurden die Küvetten im Wasserbad auf 37°C erwärmt und bei langsamem Reaktionsverlauf mit Ablesungen im Abstand von einer Minute in das Wasserbad zurückgestellt. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten und der Extinktionszunahme pro Minute als Mittelwert wurde die Enzymaktivität als m μ Mol Substrat pro Minute pro ml Kulturflüssigkeit bei 37°C und pH 6,8 berechnet (12).

7. Statistische Methode

Zum statistischen Vergleich der Ergebnisse wurde der Chi-Quadrat-Test für kleine Stichproben durchgeführt (115).

IV. Ergebnisse

1. Vorversuche

- a) Einfluss von verschiedenen Bakterienaufbereitungen auf den Reaktionsverlauf der Penicillinase-Bestimmung

Um den Einfluss verschiedener Bakterienaufbereitungen auf die hier angewandte Methode kennen zu lernen, wurde der Reaktionsverlauf mit einem gereinigten Enzym von *Bacillus cereus* (Penicillinase Riker, Neutrapen) alleine und in Gegenwart von Bakterien geprüft.

Dazu bestand die zu untersuchende Probe zunächst aus einer Neutrapen-Verdünnung und Kochsalz, dann aus Mischungen dieses Enzyms mit einem Ultraschall-Homogenat einer *Sarcina-lutea*-Kultur, einer 1:32 verdünnten Bouillon-Kultur von *Proteus*-Bakterien und einer Puffer-suspendierten *E.coli*-Kultur, die mit Toluol ausgeschüttelt worden war. Die benutzten Stämme produzierten keine Penicillinase.

Die stärkste Abweichung in der Extinktionszunahme pro Minute um 7 % von der des unversetzten Enzyms zeigte sich in Gegenwart des Ultraschall-Homogenats.

b) Penicillinaseaktivität in wachsenden Kulturen
gramnegativer Bakterien

Bei zwei E.coli-Stämmen wurde die Penicillinase -
aktivität in der frühen, mittleren und späten
logarithmischen Wachstumsphase, am Übergang in
die stationäre Phase und in einer stationären
Kultur gemessen.

Zu diesen Zeitpunkten des Wachstums wurden die
Proben jeweils entnommen aus:

- der unveränderten Kultur,
- der mit Toluol ausgeschüttelten Kultur,
- und nach dem Zentrifugieren aus dem Über-
stand der Kultur,
- der Suspension der Keime in 0,1 m Phos -
phat-Puffer vom pH 6,8
- und aus dieser Suspension nach dem Aus-
schütteln mit Toluol.

Während der logarithmischen Wachstumsphase ist
eine geringe Enzymaktivität in der Kultur und
in Puffer-suspendierten Zellen nachweisbar, die
zu Beginn (7 Stunden nach Einsaat) und während
der stationären Phase (16 Stunden nach Einsaat)
deutlich höher wird (Abbildung 1).

Nach Zentrifugieren der Kultur konnte im Überstand

erst am Ende der logarithmischen Wachstumsphase Enzymaktivität gefunden werden.

Nach Einwirkung von Toluol wurde in den Kulturen und bei Puffer-suspendierten Keimen eine weit - aus höhere Penicillinaseaktivität gemessen, als bei unveränderten Zellen.

Die so freigesetzte Enzymaktivität erreichte in der späten log-Phase ihr Maximum.

Die Toluol-behandelten Kulturen zeigten jedoch eine niedrigere Enzymaktivität als die gleichen in Puffer suspendierten mit Toluol ausgeschüttel - ten Zellen, mit Ausnahme der frühen und mittleren logarithmischen Wachstumsphase.

Während die Suspension der Bakterien beim stets gleichen pH-Wert erfolgte, befanden sich die Keime in der Kultur in einem zunehmend sauren Milieu. Es schien naheliegend, daß die Unterschiede der Enzymaktivitäten nach Zellzerstörung mit Toluol mit den unterschiedlichen Wasserstoff - ionenkonzentrationen zusammen hingen.

Wurden die Keime einer wachsenden E.coli-Kultur in Puffer verschiedener pH-Werte suspendiert, so ergab sich die größte Enzymaktivität bei pH-Werten des Puffers von 6,8 bis 7,0

(Abbildung 2).

Wurde bei einer gleichbeschaffenen Kultur vor Einwirkung von Toluol der pH-Wert durch Zugabe von HCl oder NaOH verändert, so ergab sich die größte Enzymaktivität bei einem pH-Wert der Kultur von 7,2 (Abb.3). Beim Ausschütteln der suspendierten Keime mit Toluol in dem dafür günstigsten pH-Wert, (Abb.1), ist der Unterschied der ermittelten Enzymaktivität zu der in der wachsenden Kultur besonders deutlich. Wird der pH-Wert der Kultur auf den für die Enzymfreisetzung günstigsten Wert gebracht, erreicht man eine Enzymaktivität, die etwa 10 % unter der in der Suspension gefundenen liegt.

Wurden die Kulturen nach Erreichen der späten log-Phase des Wachstums 24 Stunden lang in Eiswasser aufbewahrt, so verhielt sich die durch Toluol freigesetzte Penicillinasemenge gegenüber der Wasserstoffionenkonzentration wie in einer frischen Kultur (Abb.5).

In 0,1 m Phosphatpuffer - Suspensionen gleicherart gehaltener Keime lag der für das Ausschütteln mit Toluol günstigste pH-Wert in einem mehr alkalischen Bereich gegenüber Suspensionen, die von frisch gewachsenen Bakterien hergestellt worden waren (Abb.2).

Bei allen weiteren Penicillinase-Bestimmungen in Kulturen gramnegativer Bakterien wurde der pH-Wert der Kultur gemessen und mit der erforderlichen Menge NaOH auf 7,2 erhöht.

c) Vergleichbarkeit der Penicillinasen von *Ps.pyocyanea* gegenüber der anderer gramnegativer Bakterienarten. Wegen der Besonderheiten des Wachstums von *Ps.pyocyanea* mussten für diesen Keim andere Kulturbedingungen (s.S.13) gewählt werden. Es war anzunehmen, daß veränderte Wachstumsbedingungen die Enzymbildung beeinflussten. Deshalb wurde die Penicillinase bei je einem *E.coli*-, *Kl.pneumoniae*- und *Proteus mirabilis*-Stamm bestimmt, nachdem die Kulturen wie *Ps.pyocyanea* beimpft und geschüttelt worden waren.

4 1/2 Stunden nach Einsaat war bereits eine Zellzahl von 10^{11} bis 10^{12} Keimen pro ml erreicht; die Enzymaktivitäten dieser Bakterien betrugen im Mittel 158 % der Werte, die unter den üblichen Kulturbedingungen gemessen wurden.

2. Einteilung der *Proteus*- und *Klebsiella*-Stämme in Species

25 untersuchte Stämme der *Klebsiella* - Gruppe konnten auf Grund der biochemischen Reaktionen (Tabelle 2) der Untergruppe *Klebsiella pneumoniae* zugeordnet werden (30,32,95,112,116).

Von 24 schwärmenden *Proteus*-Stämmen verhielten sich in der bunten Reihe 22 wie *Proteus mirabilis* und 2 wie *proteus vulgaris*. Ein nicht-schwärmender *Proteus*-Stamm erwies sich als *Proteus morganii* (30,110,112). (Tab.3).

anzunehmen, daß veränderte Wachstumsbedingungen die Enzyymbildung beeinflussten. Deshalb wurde die Penicillinase bei je einem *E.coli*-, *Kl.pneumoniae*- und *Proteus mirabilis*-Stamm bestimmt, nachdem die Kulturen wie *Ps.pyocyanea* beimpft und geschüttelt worden waren.

4 1/2 Stunden nach Einsaat war bereits eine Zellzahl von 10^{11} bis 10^{12} Keimen pro ml erreicht; die Enzymaktivitäten dieser Bakterien betrugen im Mittel 158 % der Werte, die unter den üblichen Kulturbedingungen gemessen wurden.

C. Einteilung der *Proteus*- und *Klebsiella*- Stämme in Species

25 untersuchte Stämme der *Klebsiella*-Gruppe konnten auf Grund der biochemischen Reaktionen (Tabelle 2) der Untergruppe *Klebsiella pneumoniae* zugeordnet werden (30,32,95,112,116).

Von 24 schwärmenden *Proteus*-Stämmen verhielten sich in der bunten Reihe 22 wie *Proteus mirabilis* und 2 wie *Proteus vulgaris*. Ein nicht-schwärmender *Proteus*-Stamm erwies sich als *Proteus morganii* (30,110,112). (Tabelle 3).

Tabelle 2 : Biochemisches Verhalten von 25 Klebsiella-pneumoniae-Stämmen.

Kl.pneumoniae (25 Stämme)	Glukosespaltung mit Säure- und Gasbildung	Laktosespaltung	H ₂ S-Bildung	Beweglichkeit	Ornithindecaboxylase	Lysindecaboxylase	Indolbildung	Urease	Citratverwertung	Saccharosespaltung	Voges-Proskauer	Methylrot
Anzahl der Stämme mit positiven Reaktionen	25	25	-	-	-	25	2	23	23	23	16	8

Tabelle 3 : Biochemisches Verhalten von 25 Stämmen
der Proteus-Gruppe

Proteusspezies (25 Stämme)	Glukosespaltung mit Säure- und Gasbildung	Mannitispaltung	Maltosespaltung	Xylosespaltung	H ₂ S-Bildung	Citratverwertung	Indolbildung	
P.mirabilis (22 Stämme)	22	-	3	22	21	20	-	Anzahl der Stämme mit positiver Reaktion
P.vulgaris (2 Stämme)	2	-	2	2	2	1	2	
P.morganii (1 Stämme)	1	-	-	1	-	-	1	

3. Hemmkonzentrationen im Reihenverdünnungstest

a) Escherichia coli

Die Hemmkonzentrationen von 25 untersuchten E.coli-Stämmen zeigt Tabelle 4. Die höchsten Hemmkonzentrationen ergaben sich für Penicillin G. Für Ampicillin und Carbenicillin waren die Hemmkonzentrationen signifikant niedriger als für Cephalothin ($0,01 > p > 0,001$). Die wachstumshemmende Wirkung von Ampicillin und Carbenicillin war nicht signifikant verschieden.

Tabelle 4 : Minimale Hemmkonzentrationen von 25 untersuchten E.coli-Stämmen.

MHK in μ /ml	<2	4	8	16	32	62	125	250	500	1000	2000	>2000
Penicillin					2	4	2	2	1	2	2	1
Ampicillin	11(<16)			2	4	1	1			1		5
Carbenicillin	1	3	7	4			1		1	8(>500)		
Cephalothin				3	5	6	2	3	6(>250)			

b) *Klebsiella pneumoniae*

Die Hemmkonzentrationen von 25 *Kl.pneumoniae* - Stämmen finden sich in Tabelle 5.

Bei einer Konzentration von 125 μ /ml wurden von Cephalothin alle Stämme gehemmt, von Penicillin G und Ampicillin nur 7 bzw. 6 der 25 Stämme, während Carbenicillin bei dieser Konzentration auf keinen der Stämme hemmend wirkte.

Im Vergleich zu Carbenicillin waren Penicillin G ($0,01 > p > 0,001$) und Ampicillin ($p < 0,001$) signifikant wirksamer.

Tabelle 5 : Minimale Hemmkonzentrationen von 25 untersuchten *Klebsiella-pneumoniae*-Stämmen.

MHK in μ /ml	4	8	16	31	62	125	250	500	1000	2000	>2000
Penicillin G						7	5	5	2		6
Ampicillin					3	3	8	4	1	2	4
Carbenicillin							2	3	10	2	8
Cephalothin	1	8	10	3	2	1					

c) Proteus-Gruppe

Die Hemmkonzentrationen der Proteus-Keime zeigt Tabelle 6. Bei 22 *P.mirabilis*-Stämmen waren die Hemmkonzentrationen von Ampicillin nicht signifikant verschieden von Penicillin G, Carbenicillin und Cephalothin.

Die beiden *P.vulgaris*-Stämme wurden gehemmt von 1000 /ml Penicillin G, 31 bzw. 125 μ /ml Ampicillin, 4 μ /ml Carbenicillin und 250 bzw. 500 μ /ml Cephalothin. Der *P.morganii*-Stamm wurde von 1000 μ /ml Penicillin G und Cephalothin nicht, jedoch von 31 μ /ml Ampicillin und 4 μ /ml Carbenicillin gehemmt.

Tabelle 6 : Minimale Hemmkonzentrationen von 25 Stämmen der Proteus-Gruppe.

P.mirabilis (22 Stämme)

P.vulgaris (2 Stämme)

P.morganii (1 Stamm)

MHK in μ /ml	<2	4	8	16	31	62	125	250	500	1000	2000	>2000
Penicillin G	4	3	2			1			1	3		11
Ampicillin	11(<16)				2		1	1				10
Carbenicillin	8	6			1		1		9(>250)			
Cephalothin	4	4		1			6	6	3	1(>1000)		

d) *Pseudomonas pyocyanea*

Die Hemmkonzentrationen von 25 *Ps.pyocyanea* - Stämmen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Während die Mehrheit der Stämme von 250 μ /ml Carbenicillin gehemmt wurde, war bei dieser Konzentration nur Ampicillin bei einem Stamm wirksam. Bei einer Konzentration von 2000 μ /ml wirkte Ampicillin, nicht aber Penicillin G oder Cephalothin, hemmend auf die Mehrzahl der Stämme.

Tabelle 7 : Minimale Hemmkonzentrationen von 25 untersuchten *Ps.pyocyanea*-Stämmen

MHK in μ /ml	62	125	250	500	1000	2000	4000	8000	16000	>16000	
Penicillin G					1			3	8	13	
Ampicillin		1		2	3	10	9(>2000)				
Carbenicillin	1	7	8	4	2	1	2				
Cephalothin					1	1	23(>2000)				

e) *Staphylococcus aureus*

Die Hemmkonzentrationen von 25 *St.aureus*-Stämmen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Die Hemmkonzentrationen für Penicillin G und Ampicillin, die untereinander nicht verschieden waren, lagen höher als für Carbenicillin ($0,01 > p > 0,001$), jedoch war Cephalothin besser wirksam als Carbenicillin ($p < 0,001$).

Tabelle 8 : Minimale Hemmkonzentrationen von 25 untersuchten *St.aureus*-Stämmen.

Antibiotikum	< 0,03	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Penicillin G	1				1				1	2	2	1	4	3	7	3
Ampicillin	1				1					3		1	2	6	1	10
Carbenicillin						2	3	2	4	5	2	1	1	4	1	
Cephalothin			1	1	4	10	2	1	2		3		1			

4. Penicillinaseaktivität der untersuchten Bakterienstämme

Die Penicillinaseaktivität gramnegativer Bakterien wurde in Kulturen bestimmt, die sich bei einer Keimzahl von etwa 10^{10} /ml in der späten logarithmischen Wachstumsphase befanden und mit Toluol bei pH 7,2 ausgeschüttelt worden waren. Bei *Ps. pyocyanea* wurden stationäre Kulturen bei einer Keimzahl von 10^{11} - 10^{12} /ml untersucht.

a) *E.coli*

Von den 25 untersuchten Stämmen zeigten 6 keine Penicillinaseaktivität.

Die Penicillinaseaktivität der übrigen Stämme betrug zwischen 3 und 512 m μ Mol/min/ml, davon bei 11 Stämmen zwischen 3 und 15 m μ Mol/min/ml, bei 4 Stämmen zwischen 24 und 57 m μ Mol/min/ml, bei 4 Stämmen 102, 240, 256 und 512 m μ Mol/min/ml.

b) *Kl. pneumoniae*

Von den 25 untersuchten Stämmen zeigten 3 keine Penicillinaseaktivität.

Die Penicillinaseaktivität der übrigen Stämme betrug zwischen 3 und 324 m μ Mol/min/ml, davon

bei 16 Stämmen zwischen 3 und 19 $\mu\text{Mol/min/ml}$,
 bei 3 Stämmen zwischen 25 und 46 $\mu\text{Mol/min/ml}$,
 bei 2 Stämmen 121, 179 und 324 $\mu\text{Mol/min/ml}$.

c) *Proteus*-Gruppe

mirabilis: Von den 22 untersuchten Stämmen zeigten 8 Stämme keine Penicillinaseaktivität.

Bei den übrigen 14 Stämmen betrug die Penicillinase -
 aktivität zwischen 2 und 976 $\mu\text{Mol/min/ml}$, davon
 bei 3 Stämmen zwischen 2 und 10 $\mu\text{Mol/min/ml}$,
 bei 1 Stamm 32 $\mu\text{Mol/min/ml}$ und
 bei 10 Stämmen zwischen 230 und 976 $\mu\text{Mol/min/ml}$.

vulgaris: 2 *P.vulgaris*-Stämme zeigten keine Penicillinase -
 aktivität.

morganii: Der *P.morganii*-Stamm zeigte eine Penicillinase -
 aktivität von 38 $\mu\text{Mol/min/ml}$.

d) *Ps. pyocyanea*

Von den 25 untersuchten Stämmen zeigten 13 Stämme keine Penicillinaseaktivität.

Bei den übrigen Stämmen betrug die Penicillinase -
 aktivität zwischen 3 und 64 $\mu\text{Mol/min/ml}$, davon
 bei 9 Stämmen zwischen 3 und 16 $\mu\text{Mol/min/ml}$,
 bei 3 Stämmen zwischen 38 und 64 $\mu\text{Mol/min/ml}$.

e) *St. aureus*

Die Keime von *St. aureus* - Kulturen, die sich bei einer Zellzahl von etwa 10^{10} /ml in der späten logarithmischen Wachstumsphase befanden, waren in Glukose-Phosphatpufferlösung suspendiert. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Penicillinaseaktivität in der Suspension bestimmt. Von den 25 untersuchten Stämmen zeigte 1 Stamm keine Penicillinaseaktivität.

Bei den übrigen Stämmen betrug die Penicillin - aseaktivität zwischen 6 und 82 $\text{m}\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{ml}$, davon bei 7 Stämmen zwischen 6 und 15 $\text{m}\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{ml}$ und bei 17 Stämmen zwischen 21 und 82 $\text{m}\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{ml}$.

5. Hemmkonzentration und Penicillinaseaktivität

Anhand der Messwerte der Penicillinasebestimmungen ordneten wir die Bakterienstämme in Gruppen mit geringer ($< 20 \mu\text{Mol/min/ml}$), mittlerer ($21-100 \mu\text{Mol/min/ml}$) und mit hoher ($> 100 \mu\text{Mol/min/ml}$) Penicillinaseaktivität.

Um bei jeweils zwei Gruppen das Verhalten gegen - über einem Antibiotikum vergleichen zu können, wurde aus den Hemmkonzentrationen beider Gruppen der Zentralwert bestimmt. Die Stämme mit Hemmkonzentrationen unterhalb und oberhalb des Zentralwertes wurden dann nach ihrer Penicillinaseaktivität im Vierfelderschema aufgegliedert.

a) *E.coli*, *Kl.pneumoniae* und *P.mirabilis* (Tab.9)

Die Stämme von *E.coli*, *Kl.pneumoniae* und *P.mirabilis*, die Penicillinase bildeten, zeigten signifikant häufiger eine höhere Hemmkonzentration für Ampicillin ($0,01 > p > 0,001$) und Carbenicillin ($p < 0,001$) als Penicillinase-negative Stämme. Dieser Unterschied galt jedoch nicht für die Penicillin G- und Ampicillin - Hemmwerte.

Stellt man die Hemmkonzentrationen der Penicillinase-negativen Stämme den Hemmkonzentrationen der Stämme mit geringer Penicillinaseaktivität ($< 20 \mu\text{Mol/min/ml}$) gegenüber, so findet sich kein signifikanter Unterschied für alle vier untersuchten Antibiotika. Jedoch war der Unterschied von niedrigen Hemmkonzentrationen bei Stämmen mit geringer Penicillinaseaktivität ($< 20 \mu\text{Mol/min/ml}$) zu höheren Hemmkonzentrationen bei Stämmen mit mittlerer und hoher Penicillinaseaktivität ($\geq 21 \mu\text{Mol/min/ml}$) signifikant für die Penicilline und Cephalothin ($p < 0,001$).

Tabelle 9 : Hemmkonzentrationen und Penicillinaseaktivität von 72 Enterobacteriaceen - Stämmen.

MHK in $\mu\text{g/ml}$ (Zentralwerte)	Penicillinase		Penicillinaseaktivität in	
	-negativ	-positiv	< 20	≥ 21
	(17 Stämme)	(55 Stämme)	(30 Stämme)	(25 Stämme)
Penicillin G	125	500	250	> 2000
Ampicillin	< 16	250	125	> 2000
Carbenicillin	4	1000	250	> 250
Cephalothin	16	31	16	125

b) *Ps. pyocyanea* (Tab.10)

Die Penicillin G - Hemmkonzentrationen der Penicillinase-positiven Stämme waren höher als die der Penicillinase-negativen Stämme, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Außerdem betrug der Zentralwert der Ampicillin-Hemmkonzentrationen der 3 Stämme mit einer Penicillinase - aktivität von ≥ 21 $\mu\text{Mol/min/ml}$ mehr als der von 9 Stämmen mit geringerer Penicillinaseaktivität.

Tabelle 10 : Hemmkonzentrationen und Penicillinaseaktivität
25 *Ps.pyocyanea* - Stämmen.

in γ/ml (Zentralwerte)	Penicillinase		Penicillinaseaktivität in $\mu\text{Mol/min/ml}$	
	-negativ (13Stämme)	-positiv (12Stämme)	< 20 (9Stämme)	≥ 21 (3Stämme)
Penicillin G	16000	> 16000	> 16000	> 16000
Ampicillin	2000	2000	2000	> 2000
Chlorthalidone	250	250	250	250
Chlorthalidone	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000

c) St. aureus (Tab.11)

Zwischen den Hemmkonzentrationen der Stämme mit geringer Penicillinaseaktivität ($<20 \text{ m}\mu\text{Mol/min/ml}$) und der mit höherer Aktivität bestand kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 11 : Hemmkonzentrationen und Penicillinaseaktivität von 25 Staphylococcus-aureus-Stämmen.

MHK in γ/ml (Zentralwerte)	Penicillinase		Penicillinaseaktivität in $\text{m}\mu\text{Mol/min/ml}$	
	-negativ (1 Stamm)	-positiv (24 Stämme)	<20 (7 Stämme)	21-100 (17 Stämme)
Penicillin G	$<0,03$	125	31	500
Ampicillin	0,12	250	62	1000
Carbenicillin	0,5	16	4	16
Cephalothin	0,12	0,5	0,5	0,5

V. Diskussion der Ergebnisse

Zur quantitativen Penicillinasebestimmung wurden jodometrische Verfahren, vor allem der mikroanalytische Ansatz nach Novick (67) häufig verwendet (22). Einige Autoren entschlossen sich für andere Methoden wegen des hohen unspezifischen Jodverbrauchs der Kontrollproben (83) oder der Messproben (104) und wegen der hemmenden Wirkung von Jod auf die Penicillinase der Entero-Bakterien (34).

Diese Einwände gelten nicht bei der spektrophotometrischen Methode nach Rossmann (84), die ausserdem nicht, wie die acidimetrischen Methoden (22,78), die Aktivität eventuell vorhandener Penicillin-Acylasen erfasst (23,45).

Photometrische Methoden zur Penicillinasebestimmung, bei denen die durch den Substratabbau bedingte Extinktionsabnahme im UV-Bereich registriert wird, sind für vorgereinigte Enzyme bereits eingesetzt worden (51,69,87). Die Anwendung eines dieser Verfahren bei Suspensionen von E.coli zeigte jedoch, daß "einige Stämme Stoffe ausscheiden, die die Messungen stören" (51).

In Vorversuchen mit gereinigter *B.cereus*-Penicillinase in Gegenwart verschiedener Bakterien - aufbereitungen ergaben sich Abweichungen vom Reaktionsverlauf des reinen Enzyms, die innerhalb der in der Literatur (12,80) angegebenen Fehlerbreite von Enzymbestimmungen liegen (12,80). Die Eigenschaft des Mercuribenzoats, mit Sulfhydrylgruppen Mercaptide zu bilden (11,16), könnte zu einer Hemmung der Penicillinase führen (28,37, 46,47,84,98). Bei einer Mercuribenzoatkonzentration von $25\mu\text{M}$, wie im Reaktionsansatz verwendet, fand nur Smith (98) eine Hemmung der Penicillinase von *Aerobacter cloacae*. Ausserdem ergaben Aminosäureanalysen der Penicillinasen von grampositiven (3,22,79) und gramnegativen Bakterien (57,64) das Fehlen von Cystein im Enzymmolekül, weshalb eine Hemmung der Penicillinase durch das SH-Gruppenreagenz nicht eintritt (28,46).

Im Zusammenhang mit Penicillinasebestimmungen wurde Mercuribenzoat von Steinmann (106) eingeführt, um damit den Induktionsvorgang zu unterbrechen. Wir versuchten eine Induktion des Enzyms nicht, da die Penicillinasen gramnegativer Bakterien selten induzierbar sind (99) und die Bedeutung der Penicillinase-Induktion für den

infizierten Organismus schwierig abzuwägen ist (78).

Die Penicillinase gramnegativer Bakterien gilt als intrazelluläres Enzym (37,76,97,99), weil Enzymaktivität im Kulturmedium nur selten und in geringem Ausmaß gefunden wurde (56,66,72,97). Pollock (74) wies auf die Bedeutung der Autolyse hin, die extrazelluläre Enzymaktivität vor - täuschen kann. Auch nach Einwirkung eines Penicillins auf gramnegative Bakterien-Kulturen wurde Penicillinase im Kulturmedium mehrfach beobachtet (19,37,50,88,97). Dies konnte von Smith (97) als Folge der Beschädigung einer Enzym und Substrat trennenden Permeabilitätsschranke erklärt werden.

Wegen dieser Permeabilitätsschranke ist vor Messung der Enzymaktivität ein Aufschluss der Bakterienzellen mit Ultraschall (8,28,31,36,38, 43,47,70,72,91) oder in Pressen (37,97,99) gebräuchlich.

Aber auch mit Methoden, die die Zellstruktur nicht aufheben, kann intrazelluläre Penicillinase freigesetzt werden. So durch Bildung von Protoplasten (89) oder Sphäroplasten (56,57), durch osmotischen Schock (44,63) oder durch Einwirkung von Polymyxin B (109) oder Toluol (20,85,86,97,109).

Eine Hemmwirkung von Toluol auf Penicillinase besteht nach Percival (72) nicht.

Nach Smith (97) und Jackson und De Moss (49) lysiert Toluol die Bakterienzelle nicht, bewirkt jedoch den Austritt von 85 % der Nukleinsäuren und 25 % des Gesamt-Proteins der Zelle bei *E.coli*.

Bei unseren Untersuchungen zeigten die aus Toluol-behandelten Kulturen und Bakteriensuspensionen zur Penicillinasebestimmung entnommenen Proben eine höhere UV-Absorption als Proben von intakten Organismen.

Datta und Kontomichalou (27) berichten, daß durch Toluol nur bis zu 35 % der im Ultraschall-Homogenat gefundenen Penicillinaseaktivität freigesetzt wird.

Lindqvist (56) dagegen fand, daß Ultraschallbehandlung eines *E.coli*-Stammes die Enzymaktivität nicht steigert, wenn die Zellhülle defekt war.

Bei Smith (97) war die Enzymaktivität von *E.coli* nach Toluol-Behandlung um das gleiche erhöht, wie nach Zerstörung der Bakterien in einer Presse.

Für die durch Toluol freigesetzte Penicillinaseaktivität von E.coli-Bakterien fanden wir eine pH-Abhängigkeit (s.Abb. 2 und 3)

Dafür darf vielleicht die Annahme Pollocks (73) herangezogen werden, daß die Ablösung der Penicillinase von oberflächlichen Orten der Zellhülle von einer noch unbekannten enzymatischen Reaktion kontrolliert wird.

Nach Toluol-Ausschütteln bestimmten wir in exponentiell wachsenden Kulturen von E.coli eine geringere Penicillinaseaktivität, als bei Keimen, die sich im gleichen Stadium des Wachstums befanden, jedoch vom Medium getrennt und in Puffer suspendiert waren. Dabei war in beiden Fällen das Optimum des pH-Wertes eingestellt (Abb. 2 und 3). Geringe Verluste an Enzymaktivität, die beim Zentrifugieren, Abgießen des Überstandes und Suspendieren auftreten, (41), wurden nicht berücksichtigt.

Burman et al (19) beobachteten ebenfalls in wachsenden Kulturen von E.coli eine geringere Penicillinaseaktivität als in Phosphatpuffer-Suspensionen. Sie hielten es für wahrscheinlich,

daß die Penicillinase unter der Kontrolle von nieder - molekularen, hemmenden Stoffwechselprodukten steht, die bei der Zellwandsynthese auftreten.

In Suspensionen von 24 Stunden in Eiswasser aufbewahrten Bakterien ergab sich ein mehr alkalisches pH-Optimum für die Enzymfreisetzung durch Toluol als in Suspensionen frischer Kulturen. Möglicherweise sind durch diese Art der Vorbehandlung Veränderungen der Zellwand eingetreten, die in der Kulturflüssigkeit die Bedingungen des Zellaufschlusses nur wenig beeinflussten (Abb.3), jedoch in einem chemisch anderen Milieu wirksam wurden (Abb.2). In der Kultur und in Ganzzellen-Suspensionen von E.coli war die Penicillinaseaktivität während der logarithmischen Wachstumsphase gleichbleibend gering und stieg mit Beginn der stationären Phase an. Ab diesem Zeitpunkt war auch im Medium eine Enzymaktivität nachweisbar (Abb.1), die auf autolytische Veränderungen hinweist, wodurch die Zellwände undicht werden und das intrazelluläre Enzym austritt (74).

Durch Ausschütteln mit Toluol wurde die während des exponentiellen Wachstums stark zunehmende Penicillinaseaktivität nachweisbar. Die intrazelluläre Enzymaktivität nahm mit Beginn der stationären Phase ab. Diesen Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Alter der Kulturen zeigten Huber et al (46) bei Escherichia intermedia. Bei einer Ampicillin-resistenten Variante eines E.coli-Stammes beschrieben Percival et al (72)

eine fortlaufende Zunahme der Penicillinaseaktivität im Kulturfiltrat zwischen der 4. und 10. Stunde des Wachstums. Eine Abnahme der Penicillinaseaktivität am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurde bei intakten Kulturen gramnegativer Bakterien von Zemelman et al (117) beobachtet. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen zeigten Ozer und Saz (71) bei einem *Bacillus-cereus*-Stamm, daß die β -Lactamase-Aktivität während des vegetativen Wachstums gering ist und mit Beginn der Sporenbildung erst ihren höchsten Wert erreicht. Der Quotient aus Penicillinaseaktivität zerstörter Zellen und Penicillinaseaktivität intakter Zellen wurde als Permeabilitätsfaktor bezeichnet (37,38,39,41). Dieser Faktor ist ein Maß für die selektive Zugangsbehinderung verschiedener Substrate zum zellgebundenen Enzym. Für Penicillin G beträgt nach Hamilton-Miller (41) und Smith (99) der Permeabilitätsfaktor 1 bis 10 in stationären *E.coli*-Kulturen.

In exponentiell wachsenden *E.coli*-Kulturen dagegen konnten Datta und Kontomichalou (27) die Penicillinaseaktivität durch Zellzerstörung um mehr als das 60-fache erhöhen.

Für die beiden von uns genauer untersuchten *E.coli*-Stämme lassen sich je nach Wachstumsphase unterschiedliche Permeabilitätsfaktoren für Puffer-suspendierte Keime errechnen.

2 Stunden nach Einsaat war die Benzylpenicillin-Hydrolyse bei Toluol-behandelten Keimen 4-mal größer als bei unzerstörten Bakterien.

Der Permeabilitätsfaktor stieg während des Wachstums an, betrug nach 3 Stunden 50, nach 4 1/2 Stunden 70, und fiel nach 7 bzw. 16 Stunden auf 23 bzw.

6 ab. Ebenfalls eine Steigerung bis um das 50-fache beschrieben Rozanski et al (86) für die Ampicillin-Hydrolyse 3-stündiger E.coli-Kulturen, die mit Toluol aufbereitet waren. Datta und Richmond (28), die Ultraschall für die wirksamste Aufbereitungsmethode hielten, erzielten bei E.coli-TEM in der späten log-Phase sogar eine 130-fache Zunahme der Enzymaktivität durch Zellaufschluss. Nach Rozanski (86) besteht auch bei den übrigen gramnegativen Bakterien eine Permeabilitätsschranke, die mit Toluol aufgehoben werden kann.

Wir untersuchten die Aktivität der ungereinigten Penicillinase in Toluol-ausgeschüttelten Kulturen von 100 Stämmen gramnegativer Bakterien und in Suspensionen von 25 Staphylococcus-aureus-Stämmen, die aus Untersuchungsmaterial klinischer Herkunft isoliert worden waren.

Während hochgereinigte, zellfreie Enzymextrakte für enzymologische Bestimmungen verwendet werden, gilt das ungereinigte Enzym für die Deutung der Ergebnisse auf klinischer Basis als geeigneter (39).

Bei den 68 Penicillinase-produzierenden Stämmen gramnegativer Bakterien betrug die Enzymaktivität zwischen 2 und 976 $\mu\text{Mol/min/ml}$ Kulturflüssigkeit. Dabei befanden sich die Kulturen in der späten logarithmischen Wachstumsphase und enthielten 10^{10} Keime/ml. Die Enzymaktivität wurde in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 6,8 und 37°C bestimmt. Die *Ps.pyocyanea*-Stämme stellen eine Ausnahme dar, weil stationäre Kulturen bei einer Keimzahl von 10^{11} bis $10^{12}/\text{ml}$ untersucht wurden. Ausserdem ermöglicht das Schütteln der *Ps.pyocyanea*-Kulturen gegenüber den übrigen Bakterienarten eine gesteigerte Wachstumsrate.

Da Burman et al (19) bei *E.coli* zeigten, daß bei beschleunigter Zunahme der Keimzahl eine erhöhte Penicillinaseproduktion stattfindet, können die von uns gefundenen Penicillinaseaktivitäten bei *Ps.pyocyanea* nicht nur unter Berücksichtigung der höheren Keimzahl mit der Enzymaktivität der

übrigen Stämme verglichen werden.

Will man die Penicillinaseaktivität aller Stämme mit den Werten anderer Untersucher vergleichen, oder die in der Literatur angegebenen Werte einander gegenüberstellen, so stößt man auf die Schwierigkeit, unterschiedliche Bestimmungsmethoden, verschiedene Enzymaufbereitungen und Bezugssysteme in Betracht ziehen zu müssen. Das Problem wird deutlich an den Penicillinasebestimmungen bei *E.coli* K 12, die von mehreren Autoren durchgeführt wurden.

Datta und Kontomichalou (27) fanden jodometrisch eine Aktivität von $0,1 \mu\text{Mol/h/mg}$ Trockengewicht bei pH 7,0 und 30°C , wobei die exponentiell wachsenden Keime in destilliertem Wasser suspendiert und mit Ultraschall zerstört waren. Nach Infektion von *E.coli* K 12 mit dem R-Faktor TEM betrug die Penicillinaseaktivität unter gleichen Bedingungen $125 \mu\text{Mol/h/mg}$ Trockengewicht.

Hamilton-Miller (42), der die Hydroxylamin-Methode benutzte, gibt für *E.coli* K 12 eine Penicillinaseaktivität von $1,5 \text{ mMol/min/ml}$ an. Der Messwert bezieht sich auf eine Suspension von 10^9 Keimen/ml in $0,025 \text{ M}$ Phosphatpuffer bei pH 7,4 und 37°C .

Diese Keime einer stationären Kultur waren mit Ultraschall zerstört und die Enzymaktivität im zellfreien Extrakt des Homogenats bestimmt worden. Unter den gleichen Bedingungen ergab sich für die den R-Faktor TEM tragenden Keime von *E.coli* K 12 eine Penicillinaseaktivität von 1419 $\mu\text{Mol/min/ml}$. Fullbrook et al (35) bestimmten jodometrisch für *E.coli* K 12 eine Benzylpenicillin-Hydrolyse von 0,02 $\mu\text{g/min/ml}$ im zellfreien Extrakt eines Ultraschallhomogenats, der dem Enzymgehalt von 10^8 Bakterien pro ml entsprach.

Trotz dieser Verschiedenheiten ist den Arbeiten dieser und anderer Autoren (20,47,70,86,91,117) zu entnehmen, daß die Penicillinaseaktivität gramnegativer Bakterien auch innerhalb einer Species unter Standardbedingungen um jeden Faktor von 1 bis etwa 10^3 variieren kann.

Die Penicillinaseaktivitäten der von uns untersuchten gramnegativen Bakterien zeigten eine ähnliche Breite. Jedoch lagen die Messwerte häufig in einem niedrigen ($<20 \mu\text{Mol/min/ml}$) oder in einem hohen Bereich ($>100 \mu\text{Mol/min/ml}$) und seltener dazwischen (21 bis $100 \mu\text{Mol/min/ml}$). Während bei den *E.coli*-und *Kl. pneumoniae*-Stämmen

eine niedrige und mittlere Penicillinaseaktivität überwog, war bei den *P.mirabilis*-Stämmen eine hohe Penicillinaseaktivität signifikant häufiger ($0,01 < p < 0,02$). Im Gegensatz zu diesen Organismen bildeten nur 12 von 25 *Ps.pyocyanea*-Stämmen Penicillinase, die überwiegend niedrig war und nur bei einem Stamm 64 $\mu\text{Mol/min/ml}$ erreichte. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Rozanski et al (86) überein, die bei 26 von 44 nicht induzierten *Ps.aeruginosa*-Stämmen kleine Mengen von Penicillinase beobachteten. Auch nach Sykes und Richmond (103) ist die Penicillinasebildung bei *Ps.aeruginosa* ohne Induktion selten. Diese Untersucher fanden nur bei 6 von 56 Stämmen konstitutiv (nicht induzierbar) gebildete Penicillinase. Bei dem Stamm N.C.T.C.8230 (50,88) und bei weiteren 8, von Garber und Friedman (36) beschriebenen Stämmen, konnte auch in aufgeschlossenen Zellen keine Penicillinase nachgewiesen werden ausser dann, wenn die Kulturen in Gegenwart sehr hoher Konzentrationen (4 bis 10 mg) von Benzylpenicillin gewachsen waren.

Induzierbarkeit der Penicillinase wurde auch bei *P.vulgaris*, *P.morganii* und *P.rettgeri* beschrieben (7,8,38,108). Demnach bilden diese Species keine oder nur geringe "basale" (41) Penicillinase,

wenn ein Induktor fehlt (91). Wir konnten bei 2 *P.vulgaris*-Stämmen keine Penicillinase feststellen, bei dem *P.morganii*-Stamm jedoch eine Aktivität von 34 $\mu\text{Mol/min/ml}$, die ohne Induktion gebildet wurde.

Auch die von uns bestimmte Penicillinase von *St.aureus*-Stämmen war nicht induziert worden. Die Werte betrugen zwischen 6 und 82 $\mu\text{Mol/min/ml}$ und beziehen sich auf eine Glukose-Phosphatpuffer-Suspension, in der 10^{10} Keime pro ml eine Stunde bei 37°C inkubiert waren. Da die Zellen nicht aufgeschlossen wurden, bestimmten wir somit die Penicillinasemenge, die nach Coles und Gross (24,25) in Gegenwart von Glukose und Phosphat aus Ionenbindungen an der Zelloberfläche freigesetzt wird und den Anteil der zellgebundenen Staphylokokken-Penicillinase, der für Benzylpenicillin zugänglich ist. Eine Permeabilitätsschranke für Substrate der zellgebundenen Penicillinase ist bei Staphylokokken nicht mit Sicherheit anzunehmen, da zwar manche Untersucher nach Zellzerreissung eine Steigerung der Penicillinaseaktivität beschrieben, andere jedoch diese Beobachtung nicht machten (22,78). Das von Staphylokokken als Exo-penicillinase während des wachstums ins Medium

abgegebene Enzym bestimmten wir nicht. Dessen Anteil an der Gesamt-Penicillinase schwankt von Stamm zu Stamm zwischen 1 % und 60 % (78) oder nach Novick (68) zwischen 5 % und 50 %, wobei der Anteil vom jeweiligen Plasmid in Abhängigkeit von der Umgebung gesteuert wird.

Die von uns gemessenen Penicillinaseaktivitäten von *St.aureus*-Stämmen sind niedriger, als die der Stämme von *E.coli*, *Kl.pneumoniae* und *P.mirabilis* mit relativ hoher Penicillinaseproduktion.

Ähnlich bestimmten Sawai et al (90) jodometrisch für nicht induzierte Staphylokokken Penicillinaseaktivitäten, die im mittleren Bereich der von diesen Autoren mit gleicher Methode untersuchten Penicillinase von gramnegativen Bakterien liegen.

Die "Spuren" nicht induziert gebildeter Penicillinase reichen nach Pollock (75) nicht aus um die Staphylokokken selbst gegenüber kleinen Penicillin-konzentrationen zu schützen. Andere Autoren (9,36, 55,106) zeigten jedoch, daß der Induktionseffekt bei *St.aureus* mit niedrigen Penicillinkonzentrationen im Nährboden auslösbar ist, und schon 3 bis 15 Minuten nach Kontakt der Keime mit dem Antibiotikum nachweisbar wird. Dadurch sind Penicillinase-bildende Staphylokokken, trotz geringer basaler

Enzymaktivität, in der Lage, hohe Hemmkonzentrationen im Reihenverdünnungstest gegenüber den Penicillinase-negativen Stämmen zu erreichen. So fanden wir bei einem Penicillinase-negativen Stamm eine niedrigere Hemmkonzentration für Penicillin G als bei den übrigen 24 Penicillinase-positiven Stämmen. Bei diesen waren die Hemmkonzentrationen für Penicillin G und Ampicillin nicht signifikant verschieden, entsprechend dem linearen Zusammenhang zwischen Penicillin G- und Ampicillin-Hemmkonzentration, der von Mitsuhashi (62) beschrieben wurde. Die Wirkungslosigkeit von Ampicillin gegenüber Penicillinase-bildenden Staphylokokken beruht nach Rolinson und Stevens (81) auf der Inaktivierung dieses Antibiotikums durch das Enzym. Dazu konnten Auhagen et al (5) sowie Smith und Hamilton-Miller (99) bei je einem St.aureus-Stamm eine Spaltungsgeschwindigkeit von Ampicillin messen, die höher als die von Penicillin G war.

Im Vergleich zu Penicillin G und Ampicillin hemmte Carbenicillin bei signifikant niedrigeren Konzentrationen das Wachstum der Penicillinase-bildenden Staphylokokken. Dagegen kamen Brumfitt et al (17) bei St.aureus zu höheren Hemmkonzentrationen für Carbenicillin als für Penicillin G

und Ampicillin. Diese Autoren hielten wie Acred et al (2) Carbenicillin für wenig stabil gegen - über der Staphylokokken-Penicillinase. Jedoch Rolinson und Sutherland (82) , die wie wir hohe Einsaatmengen im Reihenverdünnungstest benutzten, erzielten ein dem unsrigen ähnliches Ergebnis. Da die mit hoher Einsaatmenge ermittelten Hemm - konzentrationen die Wirkung der enzymatischen Inaktivierung eines Penicillins widerspiegeln, schlossen diese Untersucher auf eine gewisse Widerstandsfähigkeit des Carbenicillins gegenüber der Penicillinase von Staphylokokken. Ausserdem bestimmten Rosdahl und Rosdahl (83) mit Staphylokokken-Penicillinase eine Abbaugeschwindigkeit von Carbenicillin, die nur 60 % der von Penicillin G betrug, und für Carbenicillin eine mehr als 10 Mal grössere Michaeliskonstante als für Penicillin G. Cephalothin gilt als besonders stabil gegenüber Staphylokokken-Penicillinase (78). Auch werden nach Benner et al (10) die Cephalothin - Hemmkon - zentrationen wenig von der Einsaatmenge beein - flusst. Bei den von uns untersuchten Staphylokokken war Cephalothin signifikant wirksamer als Peni - cillin G, Ampicillin und Carbenicillin. Dies wird auch sichtbar, wenn man die verschiedenen

Hemmkonzentrationen gegen die Enzymaktivität aufträgt. (Abbildung 4). Eine Proportionalität zwischen Hemmkonzentration und Höhe der Penicillinase - aktivität konnten wir, wie Dineen (29), nicht finden, obwohl Kjellander und Finland (52) bei *St.albus* in einem vergleichbaren Diagramm einen Zusammenhang zeigen konnten. Bei den von Abu-Nassar et al (1) geprüften *St.aureus*-Stämmen standen Penicillinase und Hemmkonzentration für Penicillin G, nicht aber für einige halbsynthetische Penicilline, in einer lockeren, positiven Korrelation. Auch Sawai et al (90) beschrieben eine Parallelität von Hemmkonzentration und Penicillinase, die jedoch im Fall induktiv gebildeten Enzyms aufgehoben war. Diese Autoren vermuteten, daß der Resistenzgrad der Staphylokokken von Faktoren jenseits der differenten chemischen Eigenschaften ihrer Penicillinasen bestimmt wird, dabei aber, wie das Enzym, von genetischen Determinanten abhängig ist.

Cephalothin hemmte die *E.coli*-Stämme zwar in niedrigeren Konzentrationen als Penicillin G, aber in bedeutend höheren Konzentrationen als Ampicillin oder Carbenicillin. Nach Acred et al (2)

und Rolinson und Sutherland (82) ist E.coli gegenüber Carbenicillin ähnlich empfindlich wie gegen - über Ampicillin. Nach Brumfitt et al (17), Acred et al (2) und Silverblatt und Turck (93) jedoch ist Carbenicillin etwas weniger wirksam als Ampicillin. Wir fanden zwischen den Hemmkonzentrationen von Carbenicillin und Ampicillin bei E.coli keinen signifikanten Unterschied. Bei Kl.pneumoniae dagegen zeigte Carbenicillin wie bei anderen Resistenz - bestimmungen (2,13,14,17,82,93,105) sehr hohe Hemmkonzentrationen verglichen mit Penicillin G, Ampicillin und Cephalothin, das wie bei Eickhoff et al (32) wirksamer war, als die Penicilline. Signifikant verschiedene Hemmkonzentrationen der vier untersuchten Antibiotika konnten wir bei den P.mirabilis-Stämmen nicht feststellen. Bei der grösseren Beobachtungsreihe von Tomaschoff (110) waren im Blättchentest 80 % von P.mirabilis empfindlich für 100 μ Carbenicillin, 66,7 % und 61,8% empfindlich für 15 μ Ampicillin bzw. Cephalo - sporine. Ähnlich wurden auch in unserem Unter - suchungsgut mehr P.mirabilis-Stämme von 125 μ /ml Carbenicillin gehemmt als von 16 μ /ml Ampicillin oder Cephalothin. Während manche Autoren (2,93)

bei *P.mirabilis* Carbenicillin wirksam wie Ampicillin und günstig im Vergleich zu Cephalothin fanden, andere Untersucher aber Carbenicillin etwas weniger wirksam als Ampicillin sahen (82), bezeichneten Brumfitt et al (17) die Empfindlichkeit von *P.mirabilis* gegenüber den Penicillinen als unvorhersagbar. Die Indol-positiven *Proteus*-Stämme dagegen zeigten ein typisches Resistenzbild (2,17,82,93,96,105,110,112,114) mit den niedrigsten Hemmkonzentrationen für Carbenicillin. Diese Verhältnisse ergaben sich auch bei *Ps.pyocyanea*. Die Hemmwerte der meisten dieser Stämme betrugen das gleiche wie die von Bodey und Terrell (14) ermittelten Carbenicillin-Konzentrationen, und liegen damit höher als in einigen anderen Untersuchungen (2,13,17,82,94,96,105). Allerdings ist die große Einsaatmenge zu berücksichtigen, die zur Bestimmung hoher Hemmkonzentrationen führt (82,83). Wie Acred et al (2) und Rolinson und Sutherland (82) sahen wir häufig unvollständiges oder "fadenförmiges" Wachstum (83) in Gegenwart hoher Carbenicillin-Mengen, wobei Pigment- und Häutchenbildung nicht stattfanden. Nach den Angaben verschiedener Autoren beträgt die Carbenicillin-Hemmkonzentration von *Ps.pyocyanea* bei Verwendung hoher Einsaatmengen

das 2- bis 10-fache (17,36,105) der Werte, die sich mit verdünntem Inokulum ergeben. Dieser Einsaatmengen-Effekt konnte in den Versuchen von Brumfitt et al (17) und Rosdahl und Rosdahl (83) weder durch das Auftreten resistenter Mutanten noch durch enzymatischen Carbenicillin-Abbau erklärt werden. Wie andere Untersucher (17,21,36,103) beobachteten auch wir keinen Zusammenhang zwischen Penicillinaseaktivität und Resistenzgrad bei *Ps.pyocyanea* (Abbildung 5). Bei den Penicillinase-positiven Stämmen könnte dies bedingt sein durch das Vorliegen verschiedener Enzym-Typen mit unterschiedlichen Substrat-Profilen (48). Ausser der häufig beschriebenen Cephalosporinase-Aktivität (15,50,88) wurde ein vornehmlich als Carbenicillinase (58,65,103) wirksamer Enzymtyp von einem als Cephalosporinase, Penicillinase und in geringerem Ausmaß als Carbenicillinase wirkenden Typ abgegrenzt (48). Die beiden Carbenicillin-abbauenden Enzyme bedingen Hemmkonzentrationen, die über den höchsten von uns ermittelten Hemmwerten liegen und bei Kombination mit dem Cephalosporinase-Typ des Enzyms bis 30 mg/ml Carbenicillin erreichen können. Demnach ist anzunehmen, daß die von uns gemessenen *Pseudomonas*-Penicillinasen zum Cephalosporinase-Typ

gehören, der Carbenicillin nicht, Ampicillin langsamer als Penicillin G, und Cephaloridin etwa 4- bis 6 Mal schneller als Penicillin G hydrolysiert (48, 103). Jedoch erreichte diese β -Lactamase ihre volle Aktivität erst nach Induktion mit Penicillinen oder Cephalosporinen in Konzentrationen, die unter natürlichen oder therapeutischen Bedingungen nicht vorkommen (36,48,50,88). Unter diesem Gesichtspunkt wird der β -Lactamase eine geringe Bedeutung für die Antibiotika-Resistenz von *Ps.pyocyanea* zugeschrieben, im Gegensatz zur nicht-enzymatischen "intrinsic-resistance" (3,8,48,101). Diese Art der Resistenz ist nach Jack et al (48) vermutlich dadurch bedingt, daß das Antibiotikum nicht an den Wirkort gelangt, oder daß eine gestörte Synthese der Zellwand-Mucopeptide das Wachstum gramnegativer Organismen nicht behindert. Dennoch unterstreichen viele Autoren (27,31,70,91) bei zahlreichen Enterobacteriaceen, ausser *Ps.pyocyanea*, die Penicillinasebildung als wichtigen Faktor der Ampicillin-Resistenz. Im Ampicillin-haltigen Medium zeigte Neu (63) die Wachstumshemmung eines resistenten Coli-Stammes nach Entfernen der Penicillinase durch osmotischen Schock gegenüber der normalen Vermehrung einer enzymhaltigen Vergleichskultur.

Bei den Coli-Stämmen unseres Untersuchungsmaterials ging eine hohe Penicillinaseaktivität stets mit hohen Hemmkonzentrationen einher (Abbildung 6). Wie bei Trafford et al (111) traten jedoch auch hoch-resistente, Penicillinase-negative Stämme auf. Andererseits konnte Zemelman (117) bei Coli-Stämmen mit einer Penicillin G - Hemmkonzentration von 125 μ /ml und weniger keine Penicillinaseaktivität nachweisen. Dagegen fanden wir in diesem Hemm - bereich Penicillinase-bildende Stämme, deren Aktivität jedoch meistens gering war. Die Penicillinasebildung von Kl.pneumoniae verhielt sich annähernd gleichsinnig zu den Hemmkonzentrationen (Abbildung 7). Dies scheint der von Ayliffe (6) geäußerten positiven Korrelation zwischen Penicillinasemenge und Ampicillin-Resistenz der Klebsiellen zu entsprechen. Für die Carbenicillin - Resistenz von Kl. pneumoniae darf eine gewisse Abhängigkeit des Resistenzgrades von der Menge der Penicillinase vermutet werden, obwohl Slocombe und Sutherland (85) bei Ampicillin-spaltenden Klebsiellen einen Abbau von Carbenicillin selten sahen. Bei Cephalosporin-abbauenden Klebsiellen fand Wedeiros (60) eine mediane Hemmkonzentration von 62,5 μ /ml Cephalothin und 7,5 μ /ml Cephalothin bei

Stämmen mit geringer oder fehlender Cephalo - sporinase-Aktivität. Diesen Werten entsprechen die Cephalothin-Hemmkonzentrationen der Stämme mit hoher Penicillinase-Aktivität. Diese Ähnlichkeit scheint die Annahme zu erlauben, daß dem Enzym auch eine Cephalosporinase-Wirkung zukommt. Berücksichtigt man, daß die Cephalothin-Hydrolyse bei Klebsiellen nach Hamilton-Miller (42) nur 4-bis 15 % des Penicillin-Abbaus ausmacht, so können die im Vergleich zu den Penicillinen niedrigen Cephalothin-Hemmwerte mit der kleinen Abbau-Rate dieses Antibiotikums in Verbindung gebracht werden.

Wie E.coli und Kl.pneumoniae zeigten auch die P.mirabilis-Stämme mit hohen Hemmkonzentrationen stets hohe Penicillinase-Werte. Während die höchsten Hemmkonzentrationen der untersuchten Penicilline nur bei hoher Penicillinaseaktivität auftraten, fanden sich auch Penicillinase-negative Stämme mit höchsten Cephalothin-Hemmwerten (Abbildung 7).

Nach früheren Untersuchungen, vor allem von Hamilton-Miller (40,42) und Ayliffe (6,7,8) sind die Penicillinasen gramnegativer Bakterien in ihren Substratprofilen nach ihrer Herkunft ver -

schieden. Datta und Richmond (28) betonten jedoch, daß ein Species-spezifischer Enzymtyp nur angenommen werden kann, wenn seine Bildung chromosomal gesteuert ist. Später gelang es Sawai et al (91) die enge Verwandtschaft der chromosomalen Penicillinase von *E.coli*, *Kl.pneumoniae* und *P.mirabilis* nachzuweisen. Smith (100) und Dale und Smith (26) machten aufmerksam auf den unterschiedlichen phänotypischen Ausdruck eines gegebenen β -Lactamase-Gens in verschiedenen Organismen. Nach Jack und Richmond (47) ist auch mit der Möglichkeit der gleichzeitigen Bildung verschiedener Enzymtypen in einem Organismus zu rechnen. In unserem Material läßt sich die Häufigkeit extrachromosomaler Resistenz-Faktoren mit Hilfe der in der Literatur angegebenen Zahlen (4,54,70) nicht abschätzen, da während der üblichen bakteriologischen Keimdifferenzierung solche Gene verloren gehen können (54). Unter diesen einschränkenden Überlegungen fassten wir die *Coli*-, *Kl.pneumoniae*- und *P.mirabilis*-Stämme zu einer Gruppe zusammen (Tabelle 9). Nach dem statistischen Vergleich kann angenommen werden, daß unter Penicillinasebildnern der Resistenzgrad gegenüber den untersuchten Penicillinen und Cephalothin umso höher war, je mehr die Enzymaktivität betrug, und daß bei

Penicillinasebildung die Hemmkonzentrationen für Ampicillin und Carbenicillin höher waren als bei Fehlen des Enzyms. Jedoch bei geringer Penicillinasebildung und im Verhalten gegenüber Penicillin G und Cephalothin schienen bei diesen Stämmen andere Faktoren als die Penicillinase die Wirkung der Antibiotika zu bestimmen. Dieses Ergebnis könnte in dem von Hamilton-Miller (40) entworfenen Modell untergebracht werden. Dabei summieren sich "intrinsic-resistance" und Penicillinasewirkung zu einer Hemmkonzentration, deren Höhe die für klinische Gesichtspunkte wichtige Unterscheidung zwischen resistent und empfindlich beeinflusst.

VI. Zusammenfassung

Bei je 25 Stämmen von *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas pyocyanea* und der *Proteus*-Gruppe aus menschlichem Untersuchungsmaterial wurden Resistenzgrad und Penicillinaseaktivität untersucht. Im Reihenverdünnungstest wurden die Hemmkonzentrationen für Penicillin G, Ampicillin, Carbenicillin und Cephalothin bestimmt. Zur Messung der Penicillinaseaktivität Toluol-ausgeschüttelter Kulturen diente die photometrische Methode nach Rossmann. Die Hemmkonzentrationen von *St.aureus* und *Ps.pyocyanea* ließen, wie bei anderen Autoren, keinen Zusammenhang mit der Penicillinaseaktivität erkennen. Bei *E.coli*, *Kl.pneumoniae* und *P.mirabilis* waren

1. die Hemmkonzentrationen für Ampicillin und Carbenicillin bei Penicillinasebildnern höher als bei Penicillinase-negativen Stämmen;
2. die Hemmkonzentrationen von Stämmen mit geringer Penicillinaseaktivität nicht höher als die Hemmkonzentrationen von Stämmen ohne Penicillinasebildung;

3. bei Penicillinase-positiven Stämmen mit hoher und mittlerer Enzymaktivität die Hemmkonzentrationen höher als bei niedriger Enzymaktivität.

Dieses Ergebnis lässt sich in das von Hamilton-Miller vorgeschlagene Modell einordnen, wonach sich die Resistenz eines Stammes aus der Summe von nicht-enzymatischer Resistenz und Penicillinase-Wirkung zusammensetzt.

VII. Literaturverzeichnis

1. ABU-NASSAR, H., M. DOLAN, T. WILLIAMS und E. M. YOW:
Relationship between quantity of penicillinase
produced by staphylococci and sensitivity to
five Penicillins. Amer. J. med. Sci. 246(1963)569
2. ACRED, P., D. M. BROWN, E. T. KNUDSON, G. N. ROLINSON
und R. SUTHERLAND: New semi-synthetic Penicillin
active against *Pseudomonas pyocyanea*. Nature
215(1967)25
3. AMBLER, R. P. und R. J. MEADWAY: Chemical structure
of bacterial penicillinases. Nature 222(1969)24
4. ANDERSON, E. S. und N. DATTA: Resistance to
Penicillins and its transfer in enterobacteria-
ceae. Lancet I(1965)407
5. AUHAGEN, E., C. GLOXHUBER, G. HECHT, T. KNOTT, H. OTTEN,
E. RAUENBUSCH, K. H. RISSE, J. SCHMID, W. SCHOLTAN
und A. M. WALTER: Ampicillin-Biotol. Arzneimittelforsch. 12(1962)791

6. AYLIFFE, G.A.J.: Ampicillin inactivation and sensitivity of coliform bacilli. *J. gen. Microbiol.* 30(1963)399
7. AYLIFFE, G.A.J.: Induction of cephalosporinase and penicillinase in *Proteus* species. *Nature* 201(1964)1032
8. AYLIFFE, G.A.J.: Cephalosporinase and penicillinase activity of gram-negative bacteria. *J. gen. Microbiol.* 40(1965)119
9. BATCHELOR, F.R., J. CAMERON-WOOD, E.B. CHAIN and G.N. ROLINSON: Studies on penicillinase produced by a strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Roy. Soc. B* 158(1963)311
10. BENNER, E.J., J.V. BENNETT, J.L. BRODIE and W. M. KIRBY: Inactivation of Cephalothin and Cephaloridine by *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* 90(1965)1599
11. BENESCH, R. und R.E. BENESCH: Determination of SH-Groups in Proteins. *Methods biochem. Analysis* 10(1962)43

12. BERGMAYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim 1962
13. BLASIUS, C., H. P. MENZ und J. SANDER: Bakteriologische Untersuchungen mit Carbenicillin. Dtsch. med. Wschr. 94(1969)2501
14. BODEY, G. P. und L. M. TERRELL: In vitro activity of Carbenicillin against gram-negative bacilli. J. Bact. 95(1968)1587
15. BOWMANN, F. W., E. W. KNOLL und M. WHITE: Degradation of sodium Cephalothin by cephalosporinase produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Herellea*. Antimicrobial Agents Chemother. (1964) 334
16. BOYER, P. D.: Spectrophotometric study of the reactions of protein sulphydryl groups with organic mercurials. J. Amer. chem. Soc. 76(1954)4331
17. BRUMFITT, W., A. PERCIVAL und D. A. LEIGH: Clinical and laboratory studies with Carbenicillin. Lancet I(1967)1289

18. BRUNNER, R. und E. PROHASKA: Über die Beziehung der Penicillinase zur Penicillinresistenz bei *Escherichia coli*. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 176 (1959) 447
19. BURMAN, L. G., K. NORDSTRÖM und H. G. BOMAN: Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins. V. Physiological comparison of two isogenic strains, one with chromosomally and one with episomally mediated Ampicillin resistance. J. Bact. 96 (1968) 438
20. CHAIKOVSKAYA, S. M., R. A. MAKAROVA, P. S. BRAGINSKAYA und A. E. TEBYAKINA: Penicillinase of gram-negative bacteria and mechanism of their resistance to Benzylpenicillin and Ampicillin. Progr. Antimicrobial Anticancer Chemother. 1 (1970) 416
21. CHANG, T. W. und L. WEINSTEIN: Isolation, characterization and distribution of cephalosporinase. Antimicrobial Agents Chemother. (1963) 278
22. CITRI, N. und M. R. POLLOCK: The biochemistry and function of β -lactamase (penicillinase). Advances Enzymol. 28 (1966) 237
23. COLE, M. und R. SUTHERLAND: The role of Penicillin acylase in the resistance of gram-negative bacteria to Penicillins. J. gen. Microbiol. 42 (1966) 845

- 24.COLES,N.W. und R.GROSS:Liberation of surface-located penicillinase from *Staphylococcus aureus*.
Biochem.J.102(1967)742
- 25.COLES,N.W. und R.GROSS:Influence of organic anions on the liberation of penicillinase from *Staphylococcus aureus*.Biochem.J.102(1967)748
- 26.DALE,J.W. und J.T.SMITH:The purification and properties of the β -lactamase specified by the resistance factor R1818 in *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*.Biochem.J.123(1971)493
- 27.DATTA,N. und P.KONTOMICHALOU:Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in enterobacteriaceae.Nature 208(1965)239
- 28.DATTA,N. und M.H.RICHMOND:The purification and properties of a penicillinase whose synthesis is mediated by an R factor in *Escherichia coli*.
Biochem.J.98(1966)201
- 29.DINEEN,P.:The in vivo production of penicillinase by hemolytic *Staphylococcus aureus*.J.Immunol. 86(1961)496

30. EDWARDS, P. R. und W. H. EWING: Identification of
Enterobacteriaceae. Minneapolis 1957
31. EGAWA, R., T. SAWAI und S. MITSUHASHI: Drug resistance
of enteric bacteria. XII. Unique substrate
specificity of penicillinase produced by R factor.
Jap. J. Microbiol. 11(1967) 173
32. EICKHOFF, T. C., B. W. STEINHAUER und M. FINLAND:
The Klebsiella-Enterobacter-Serratia division.
Ann. Intern. Med. 65(1966) 1163
33. ENZYME NOMENCLATURE. Recommendations of the
International Union of Biochemistry on the
Nomenclature and Classification of Enzymes,
together with their Units and the Symbols of
Enzyme Kinetics. Amsterdam-London-New York 1965
34. EVANS, J., E. GALINDO, J. OLARTE und S. FALKOW:
 β -Lactamase of R factors. J. Bact. 96(1968) 1441
35. FULLBROOK, P. D., S. W. ELSON und B. SLOCOMBE:
R factor mediated β -lactamase in Pseudomonas
aeruginosa. Nature 226(1970) 1054

36. GARBER, W. und J. FRIEDMAN: β -Lactamase and the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to various Penicillins and Cephalosporins. *J. gen. Microbiol.* 64(1970)343
37. HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Penicillinase from *Klebsiella aerogenes*. *Biochem. J.* 87(1963)209
38. HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Inducible penicillinase in *Proteus morgani*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 13(1963)43
39. HAMILTON-MILLER, J. M. T. und J. T. SMITH: Inhibition of penicillinases from gram-positive and gram-negative bacteria by substrate analogues. *Nature* 201(1964)999
40. HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Modes of resistance to Benzylpenicillin and Ampicillin in twelve *Klebsiella* strains. *J. gen. Microbiol.* 41(1965)175
41. HAMILTON-MILLER, J. M. T., J. T. SMITH und R. KNOX: Interaction of Cephaloridine with penicillinase producing gram-negative bacteria. *Nature* 208(1965)235
42. HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Hydrolysis of Cephalo=sporins by β -lactamases from gram-negative bacteria. *Nature* 214(1967)1333

43. HENNESSEY, T.D.: Inducible β -lactamase in
Enterobacter. J. gen. Microbiol. 49(1967)277
44. HEPPPEL, L.A.: Selective release of enzymes from
bacteria. Science 156(1967)1451
45. HUANG, H.T., T.A. SETO und G.M. SHULL: Distribution
and substrate specificity of Benzylpenicillin
acylase. Appl. Microbiol. 11(1963)1
46. HUBER, F.M., P.G. CALTRIDER und S. NOBLE: β -Lactamase
activity of Escherichia intermedia. Canad. J.
Microbiol. 14(1968)349
47. JACK, G.W. und M.H. RICHMOND: A comparative study
of eight distinct β -lactamases synthesized by
gram-negative bacteria. J. gen. Microbiol. 61(1970)
43
48. JACK, G.W., R.B. SYKES und M.H. RICHMOND: The
 β -lactamases of gram-negative bacteria and their
transfer by R factors. Path. Microbiol. 36(1970)289
49. JACKSON, R.W. und J.A. DE MOSS: Effects of toluene
on Escherichia coli. J. Bact. 90(1965)1420

50. JAGO, M., A. MIGLIACCI und E. P. ABRAHAM:
Production of a cephalosporinase by *Pseudomonas pyocyanea*. *Nature* 199(1963)375
51. JANSSON, J. A. T.: A direct spectrophotometric assay for Penicillin- β -lactamase.
Biochim. Biophys. Acta 99(1965)171
52. KJELLANDER, J. O. und M. FINLAND: Studies on the penicillinase of *Staphylococcus albus*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113(1963)1031
53. KOGUT, M., M. R. POLLOCK und E. TRIDGELL:
Purification of Penicillin-induced penicillinase of *B. cereus*. *Biochem. J.* 62(1956)391
54. LEBEK, G.: Die infektiöse bakterielle Antibiotikaresistenz. Bern 1969
55. LEITNER, F., H. M. SWEENEY, T. F. MARTIN und S. COHEN:
Induction of staphylococcal penicillinase by Benzylpenicillin: Effect of pH, concentration of ferrous ion and inducer, and duration of exposure of cells to inducer. *J. Bact.* 86(1963)717

56. LINDQVIST, R.C. und K. NORDSTRÖM: Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins. VII. Purification and characterization of a penicillinase mediated by the R factor R1. J. Bact. 101(1970)232
57. LINDSTRÖM, B., H.G. BOMAN und B. STEELE: Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins VI. Purification and characterization of the chromosomally mediated penicillinase present in ampA-containing strains. J. Bact. 101(1970)218
58. LOWBURY, E.J.L., A. KIDSON, H.A. LILLY, G.A.J. AYLIFFE und R.J. JONES: Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics: Emergence of strains highly resistant to Carbenicillin. Lancet I(1969)448
59. MATTENHEIMER, H.: Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium. Berlin 1961

60. MEDEIROS, A. und T.E.O'BRIEN: Association of cephalosporinase activity, Cephalothin resistance, and episome-mediated drug resistance in *Klebsiella* strains. Antimicrobial Agents Chemother. (1966) 321
61. METZ, H. und A. MAYR: Zur Trübungsmessung in der Mikrobiologie mit Hilfe eines einfachen Aufsatzgerätes zum Photometer Eppendorf. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 200 (1966) 110
62. MITSUHASHI, S. H. HASHIMOTO, T. KASUGA und T. SAWAI: Relationship between Penicillin G resistance and susceptibility to synthetic Penicillins in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemother. (1965) 374
63. NEU, H. C.: The surface localization of penicillinase in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 32 (1968) 258

64. NEU, H.C. und E.B. WINSHELL: Purification and characterization of penicillinases from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 139(1970)278
65. NEWSOM, S.W.B., R.B. SYKES und M.H. RICHMOND: Detection of a β -lactamase markedly active against Carbenicillin in a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bact.* 101(1970)1079
66. NORDSTRÖM, K., L.G. BURLAK und K.G. ERIKSSON-GREENBERG: Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins. VIII. Physiology of a class II Ampicillin resistant mutant. *J. Bact.* 101(1970)659
67. NOVICK, R.P.: Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83(1962)236
68. NOVICK, R.P. und M.H. RICHMOND: Nature and interactions of the genetic elements governing penicillinase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* 90(1965)467

69. O'CALLAGHAN, C.H., P.W. MUGGLETON und G.W. ROSS:
Effects of β -lactamase from gram-negative
organisms on Cephalosporins and Penicillins.
Antimicrobial Agents Chemother. (1968) 57
70. OOKA, T., H. HASHIMOTO und S. MITSUHASHI:
Comparison of penicillinases produced by
R factors isolated from Ampicillin-resistant
gram-negative bacteria. Jap. J. Microbiol.
14(1970) 123
71. OZER, J.H. und A.K. SAZ: Possible involvement
of β -lactamase in sporulation in *Bacillus*
cereus. J. Bact. 102(1970) 64
72. PERCIVAL, A., W. BRUMFITT und J. DE LOUVOIS:
The role of penicillinase in determining
natural and acquired resistance of gram-
negative bacteria to Penicillins. J. gen.
Microbiol. 32(1963) 77
73. POLLOCK, M.R.: The mechanism of liberation
of penicillinase from *Bacillus subtilis*.
J. gen. Microbiol. 26(1961) 267

74. POLLOCK, M. R.: Exoenzymes. In J. C. Gunsalus und R. Y. Stanier: The Bacteria 4, 121. New York 1962
75. POLLOCK, M. R.: Penicillinase. In Resistance of Bacteria to the Penicillins, Ciba Foundation Study Group No. 13. London 1962
76. POLLOCK, M. R.: Enzymes destroying Penicillin and Cephalosporin. Antimicrobial Agents Chemother. (1964) 292
77. POLLOCK, M. R.: Origin and function of penicillinase: a problem in biochemical evolution. Brit. med. J. 4 (1967) 71
78. RAUENBUSCH, E.: Penicillin-Wirkung und Penicillin-Resistenz. Antibiotica Chemother. 14 (1968) 95
79. RICHMOND, M. H.: Wild-type variants of exo-penicillinase from *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. 94 (1965) 584

80. RICHTERICH, R.: Klinische Chemie. 3. Aufl.
Basel 1971
81. ROLINSON, G.N. und S. STEVENS: Microbiological studies on a new broad-spectrum Penicillin: "Penbritin". Brit. med. J. 2(1961)191
82. ROLINSON, G.N. und R. SUTHERLAND: Carbenicillin, a new semisynthetic Penicillin active against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents Chemother. (1967) 609
83. ROSDAHL, V.T. und ROSDAHL, N.: Minimum inhibitory concentrations of Carbenicillin against *Pseudomonas aeruginosa*. Chemotherapy 16(1971) 18
84. ROSSMANN, I., P. SIEGMUND und F. KÖRBER: Spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Penicillinase. Z. Anal. Chem. 252(1970)199
85. ROZANSKY, R. und S. BIANO: Sensitivity of strains of enteropathogenic *Escherichia coli* to Ampicillin and other antibiotics. Israel. J. med. Sci. 2(1966)165

86. ROZANSKY, R., S. BIANO, L. CLEJAN, N. FRENKEL, B. BOGOKOVSKY und G. ALTMANN: Penicillin- β -lactamase and Penicillin acylase formation by gram-negative bacteria. Israel. J. med. Sci. 5(1969)297
87. SABATH, L.D. und E.P. ABRAHAM: Cephalosporinase and penicillinase activity of *Bacillus cereus*. Antimicrobial Agents Chemother. (1965)392
88. SABATH, L.D., M. JAGO und E.P. ABRAHAM: Cephalosporinase and penicillinase activities of a β -lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*. Biochem. J. 96(1965)739
89. SARGENT, M.G., B.K. GOSH und J.O. LAMPEN: Localization of cell-bound penicillinase in *Bacillus licheniformis*. J. Bact. 96(1968)1329
90. SAWAI, T., H. HASHIMOTO, S. MITSUHASHI und S. YAMAGISHI: Drug resistance of staphylococci. V. Two types of high-resistance to Penicillin G in *Staphylococcus aureus*. Jap. J. Microbiol. 11(1967)179

91. SAWAI, T., S. MITSUHASHI und S. YAMAGISHI:
Drug resistance of enteric bacteria. XIV.
Comparison of β -lactamase in gram-negative
rod bacteria resistant to α -aminobenzyl-
penicillin. Jap. J. Microbiol. 12 (1968) 423
92. SAZ, A. K.: An introspective view of
penicillinase. J. Cell Physiol. 76 (1970) 397
93. SILVERBLATT, F. und M. TURCK: Laboratory
and clinical evaluation of Carbenicillin
(Carboxybenzylpenicillin). Antimicrobial
Agents Chemother. (1968) 279
94. SIMON, C., A. HAMACHER, V. MALERCZYK und H. J.
ROHWEDDER: Zur Blutspiegelkinetik von
Carbenicillin. Arzneimittelforsch. 21 (1971)
78
95. SLOCOMBE, B. und R. SUTHERLAND: β -Lactamase
activity and resistance to Ampicillin,
Carbenicillin and Cephaloridine of
Klebsiella, Enterobacter und Citrobacter.
Antimicrobial Agents Chemother. (1969) 78

96. SMITH, C.B., J.N. WILFERT, P.E. DANS, T.A.
KUREUS und M. FINLAND: In vitro activity
of Carbenicillin and results of treat-
ment of infections due to *Pseudomonas*
with Carbenicillin singly and in com-
bination with gentamicin. *J. Infect. Dis.*
122(1970)S14
97. SMITH, J.T.: Penicillinase and Ampicillin
resistance in a strain of *Escherichia*
coli. *J. gen. Microbiol.* 30(1963)299
98. SMITH, J.T.: Sulphydryl groups essential
for the penicillinase activity of
Aerobacter cloacae. *Nature* 197(1963)900
99. SMITH, J.T. und J.M.T. HAMILTON-MILLER:
Differences between penicillinases from
gram-positive and gram-negative bacteria.
Nature 197(1963)976
100. SMITH, J.T.: R factor gene expression in
gram-negative bacteria. *J. gen. Microbiol.*
55(1969)109

101. SUTHERLAND, R.: The nature of the insensitivity of gram-negative bacteria towards Penicillins. *J. gen. Microbiol.* 34(1964)85
102. SYKES, R. B. und M. H. RICHMOND: Intergeneric transfer of a β -lactamase gene between *Ps. aeruginosa* and *E. coli*. *Nature* 226(1970) 952
103. SYKES, R. B. und M. H. RICHMOND: R factors, β -lactamase, and Carbenicillin resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* I(1971)342
104. SCHAEF, W. und H. BLOBEL: Anreicherung und Nachweis von Staphylokokken-Penicillinase. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 214(1970)62
105. STANDIFORD, H. C., A. C. KIND und W. M. M. KIRBY: Laboratory and clinical studies of Carbenicillin against gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents Chemother.* (1968)286
106. STEINMAN, H. G.: Factors modifying induced formation of penicillinase in *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* 81(1961)895

107. STEWART, G. T.: The Penicillin Group of
Drugs. Amsterdam-London-New York 1965
108. TAUBENECK, U.: Über die Inaktivierung von
Penicillin durch *Proteus vulgaris*.
Arch. Mikrobiol. 24 (1956) 423
109. TEUBER, M.: Release of periplasmic
penicillinase from *Escherichia coli* by
toluene. Arch. Mikrobiol. 73 (1970) 61
110. TOMASCHOFF, E.: Die Ökologie und Bedeutung
der *Proteus*gruppe. Klin. Wschr. 47 (1969) 837
111. TRAFFORD, J. A. P., D. M. MACLAREN, D. A. LILLICRAP,
R. D. S. BARNES, J. C. HOUSTON und R. KNOX:
Ampicillin: a broad-spectrum Penicillin.
Lancet I (1962) 987
112. TRAUB, W. H., E. A. RAYMOND und J. LINEHAN:
Identification of enterobacteriaceae in
the clinical microbiology laboratory.
Appl. Microbiol. 20 (1970) 303

113. TURCK, M., F. SILVERBLATT, W. CLAM und .
HOLMES: The role of Carbenicillin in
treatment of infections of the urinary
tract. J. Infect. Dis. 122(1970) 829
114. WALTER, A. M. und D. HEILMEYER: Antibiotika-
Fibel. 3. Aufl. Stuttgart 1969
115. WEBER, E.: Grundriß der biologischen
Statistik. 4. Aufl. Jena 1961
116. ZABRANSKY, R. J., J. W. HAYL, F. E. DAY und G. L.
NEEDHAM: Klebsiella, enterobacter and
Serratia: Biochemical differentiation and
susceptibility to Ampicillin and three
cephalosporin-derivatives. Appl. Microbiol.
18(1969) 198
117. ZEMELMAN, R., B. SALAZAR und E. RODRIGUEZ:
Penicillinase in urine with high bacterial
counts. Ant. J. Microbiol. 1969

VIII. Abbildungen

- Abb. 1 : Penicillinaseaktivität während des Wachstums
 bei 2 E. coli - Stämmen
- Abb. 2 : ——— Suspension der Keime einer Direkt-Kultur
 - - - Suspension der Keime einer 24 Stunden in
 Eiswasser aufbewahrten Kultur
- Abb. 3 : ——— Direkt-Kultur
 - - - nach 24 Stunden in Eiswasser

Abb. 1

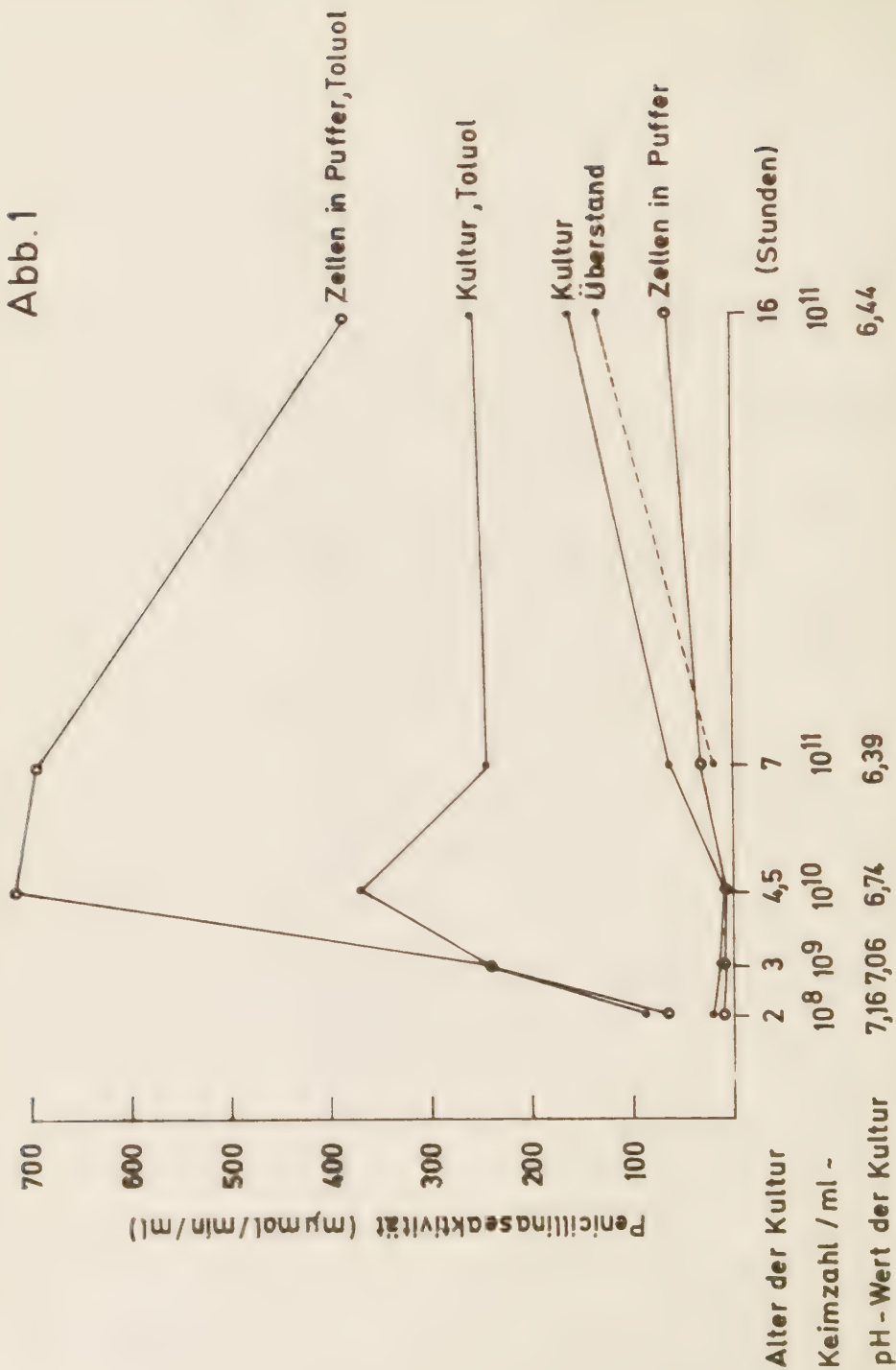


Abb. 2

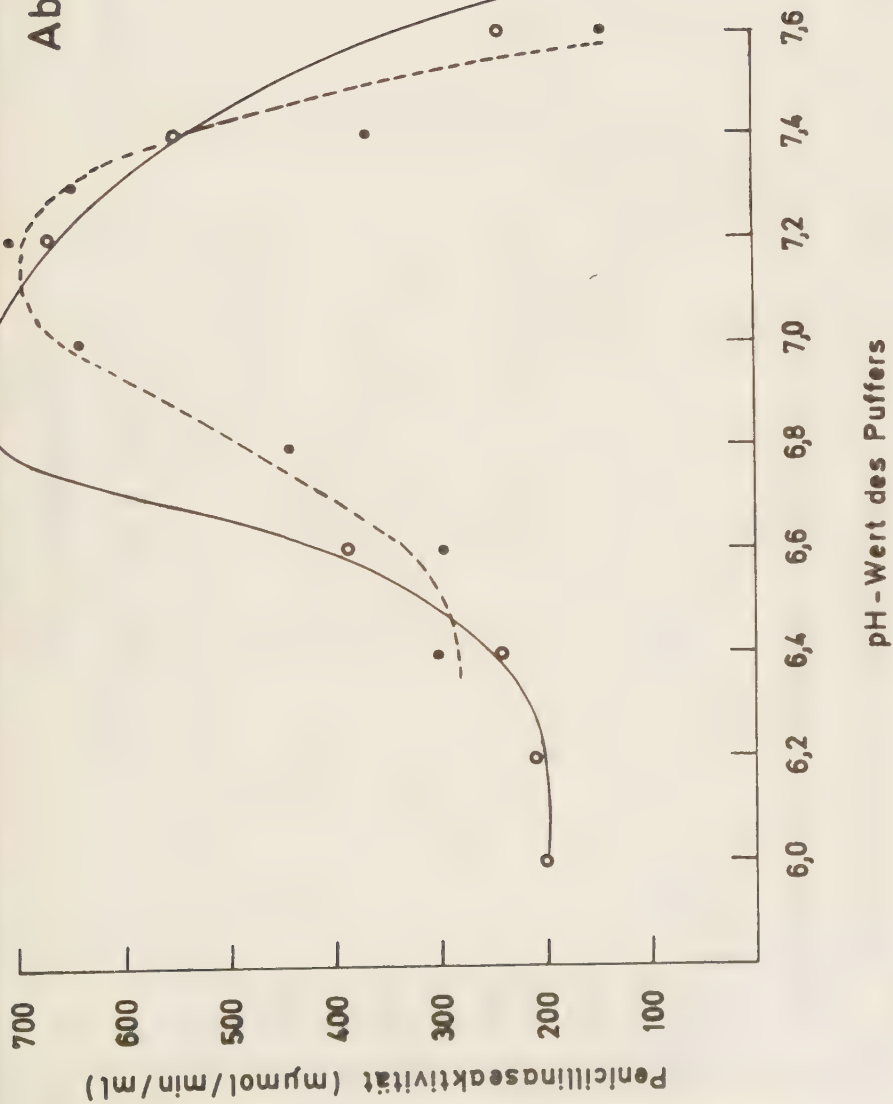


Abb. 3

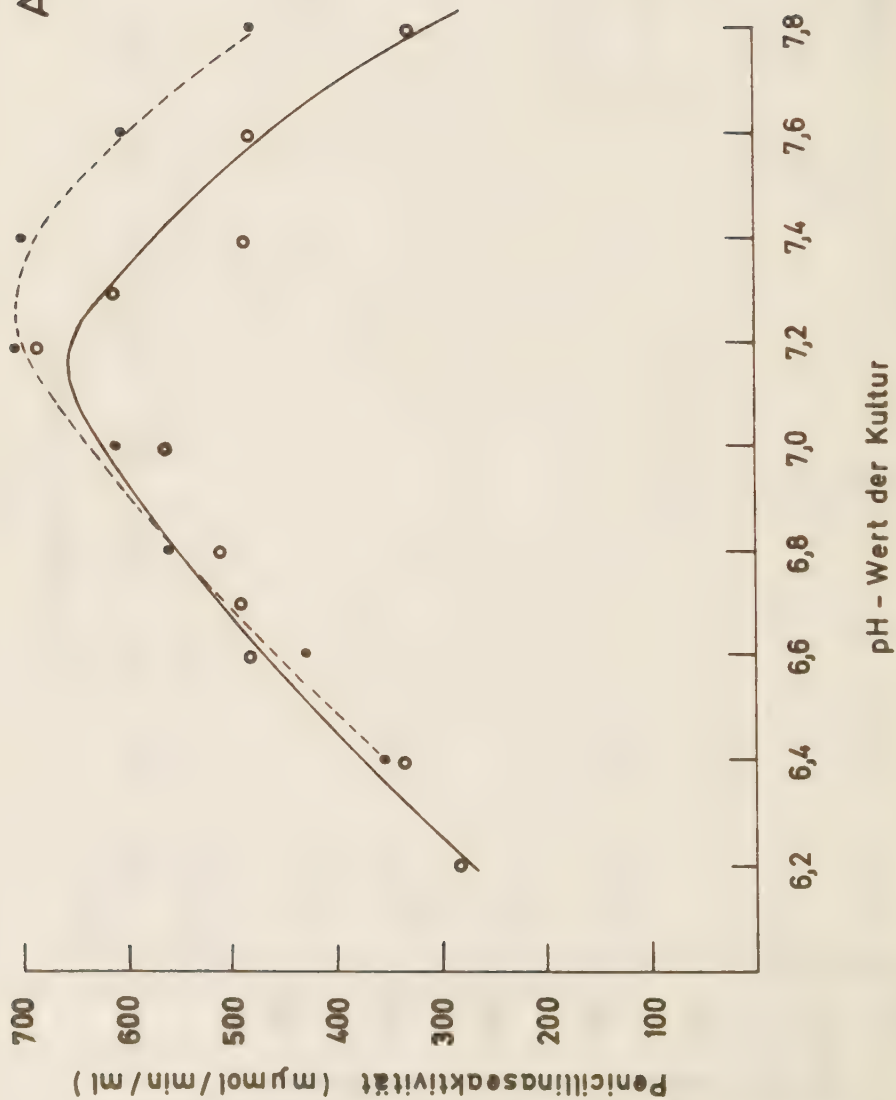




Abb. 4 Hemmkonzentration und Penicillinaseaktivität bei 24 Penicillinase-positiven *Staphylococcus-aureus* - Stämmen

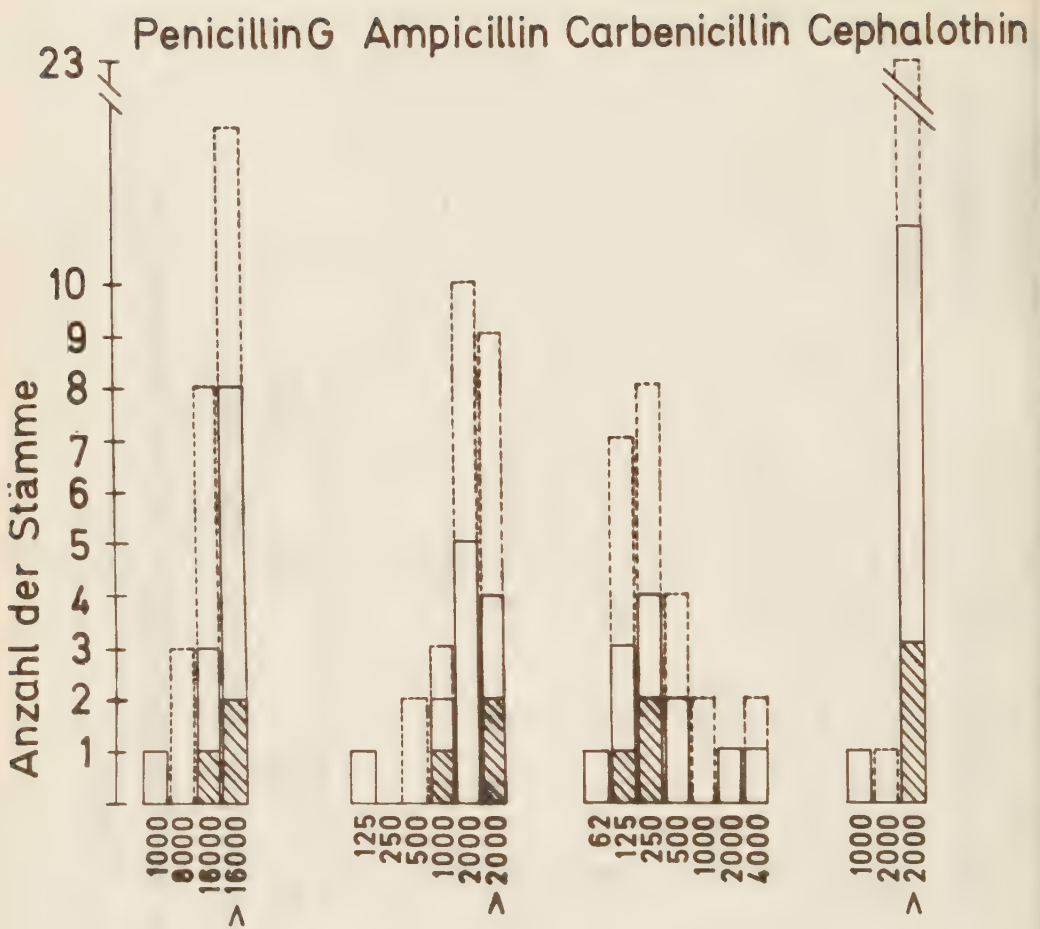
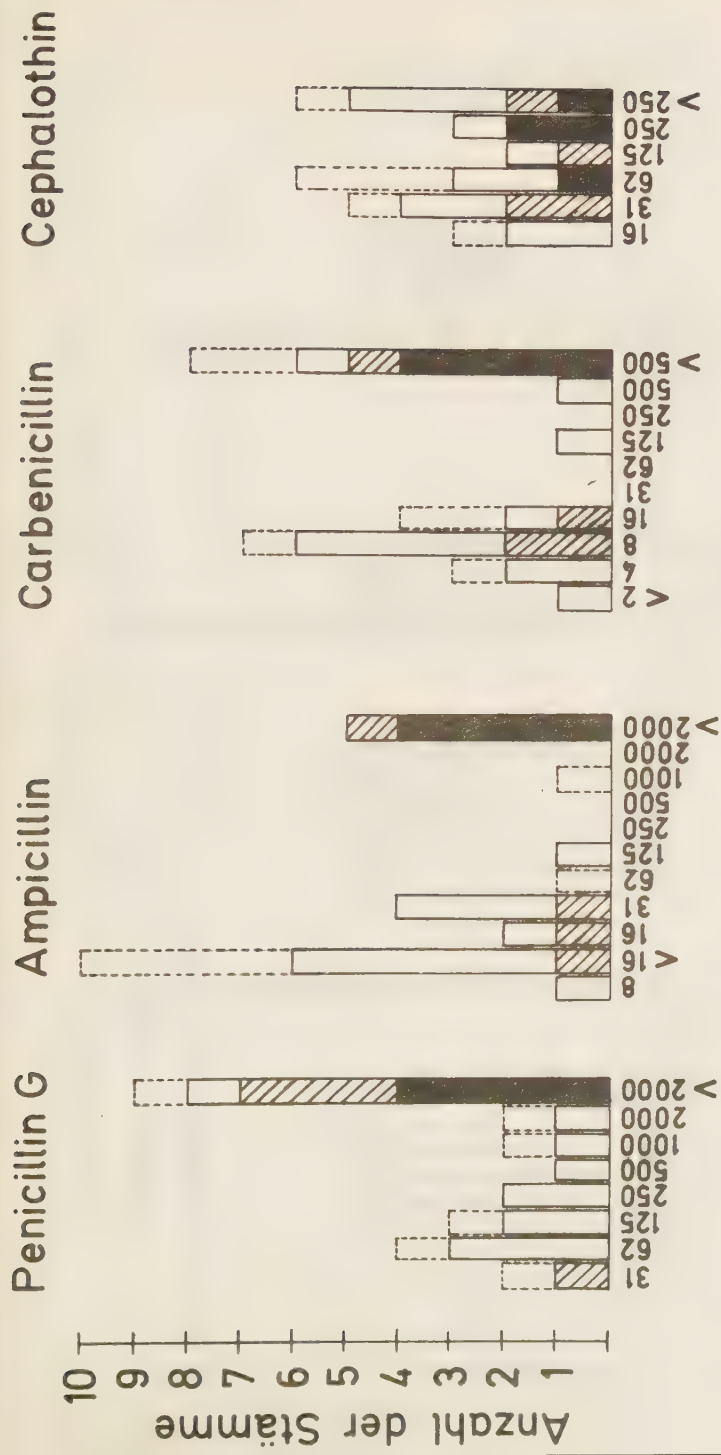


Abb.5 Hemmkonzentration und Penicillinaseaktivität von 25 *Pseudomonas-pyocyanea* - Stämmen.

Hemmkonzentrationen in mcg/ml; Penicillinaseaktivität:

□ = 0, □ = ≤ 20, ▨ = 21-100 $\mu\text{mol/min/ml}$ Kulturflüssigkeit



Herrn Privatdozent Dr.H.Metz danke ich für die
Themenstellung und stets wohlwollende Förderung.

Herrn Professor Dr.Dr.H. E y e r danke ich für sein
entgegenkommendes Interesse an der Durchführung und
Fertigstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 23.5.1942 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Julius Ohgke in München geboren.

1962 legte ich am Gisela-Realgymnasium in München die Reifeprüfung ab.

Von 1963 bis 1969 studierte ich Medizin an den Universitäten in Saarbrücken, München und Würzburg. Nach der Ärztlichen Prüfung 1969 in Würzburg war ich Medizinalassistent an der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, in der chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Oberföhring und am Max von Pettenkofer-Institut der Universität München, wo ich bis Februar 1972 als Doktorand tätig war.

Anschliessend erhielt ich die Approbation als Arzt und erfülle seitdem meine Wehrpflicht.

